

**ÜBER DAS KAKAOAROMA
UND SEINE ZUSAMMENSETZUNG**

Ernst Brunner

1979

ÜBER DAS KAKAOAROMA
UND SEINE ZUSAMMENSETZUNG

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der Ludwig - Maximilians - Universität in München



vorgelegt von

Ernst Brunner

aus München

München 1978

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Severin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 2. 1979



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die Arbeit wurde im Institut für Lebensmittel-
Technologie und -Hygiene v. F. v. der Technischen
Hochschule München, Institut für Lebensmittel-
technologie, unter Aufsicht des Herrn Professor Dr. H.
Grosche durchgeführt. Für die Unterstützung, welche
mir durch den Herrn Professor Dr. H. Grosche
während der Arbeit zufließen konnte, danke ich.

Die Arbeit ist dem Herrn Professor Dr. H. Grosche
als Dank für die Unterstützung der Lebensmittel-
technologie gewidmet.
Meinen Eltern
gewidmet

Die Arbeit wurde im Institut für Lebensmittel-
technologie v. F. v. der Technischen Hochschule
München, Institut für Lebensmittel-technologie,
unter Aufsicht des Herrn Professor Dr. H. Grosche
durchgeführt.

Die Arbeit ist dem Herrn Professor Dr.
H. Grosche als Dank für die Unterstützung der
Lebensmitteltechnologie gewidmet. Die Arbeit
wurde im Institut für Lebensmittel-technologie
v. F. v. der Technischen Hochschule München,
Institut für Lebensmittel-technologie, unter
Aufsicht des Herrn Professor Dr. H. Grosche
durchgeführt.

Diese Arbeit wurde im Institut für Lebensmittel-technologie und Verpackung e. V., an der Technischen Universität München, Institut der Fraunhofergesellschaft, unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Th. Severin angefertigt. Für die Unterstützung meiner Arbeit möchte ich Herrn Professor Dr. Th. Severin meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Professor Dr. R. Heiss, dem ehemaligen Direktor des Instituts für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e. V. und der jetzigen Institutsleitung bin ich für die großzügige Bereitstellung aller Hilfsmittel bei der Durchführung der Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. W. Mohr danken, der mich durch wertvolle Ratschläge und stets wohlwollende Hilfe tatkräftig unterstützt hat.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. W. Grosch für seine Hilfe bei der Durchführung von massenspektrometrischen Analysen in der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie.

Inhaltsverzeichnis

=====

	Seite
A Allgemeiner Teil =====	
1. Einleitung	1
1.1. Was ist Kakaoaroma?	1
1.2. Zur Bildung des Kakaoaromas	4
1.3. Übersicht über Isolierungsmethoden anderer Autoren und bereits identi- fizierte Substanzen	9
1.4. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Darstellung der Aromastoffe	17
2.1. Isolierung und Behandlung der Vorstufen	17
2.2. Isolierung der Aromastoffe	19
3. Versuche zur Auftrennung der Aromafraktionen	25
3.1. Versuche zur Vorfraktionierung	25
3.2. Versuche zur gaschromatographischen Untersuchung auf gepackten Säulen	30
3.3. Trennung auf Kapillarsäulen	33
3.3.1. Optimierung des Trenneffektes	33
3.3.2. Versuche zur Trennung	38
3.4. Bestimmung der stickstoffhaltigen Sub- stanzen mittels stickstoffselektivem Detektor	41
4. Massenspektrometrische Identifizierungs- versuche nach kapillargaschromatographischer Auftrennung	45

	Seite
4.1. Analyse der mittelflüchtigen Fraktion	45
4.2. Analyse der schwerflüchtigen Fraktion	54
4.3. Analyse der kakaotypischen Fraktion aus der Horizontaldestillationsanlage	65
5. Gaschromatographische Untersuchung von Aromafraktionen aus unconchierten und conchierten Schokoladenmassen	70
6. Zusammenfassung	76
7. Literaturverzeichnis	80
 B Experimentieller Teil =====	
1. Isolierung der Vorstufen	84
1.1. Extraktion	84
1.2. Reinigung	84
1.3. Bestimmung des Bräunungsgrades von Vorstufengemischen	85
2. Röstung von Aromavorstufen	85
2.1. im Gaschromatographen	85
2.2. im Trockenschrank	86
3. Isolierung der Aromastoffe	86
3.1. Extraktion	86
3.2. Hochvakuumdestillation	87
4. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	87

	Seite
5. Vorfraktionierung mittels einer Horizontaldestillationsanlage	88
6. GC - Analyse von Aromafractionen auf gepackten Säulen	89
7. Massenspektrometrische Untersuchungen	90
8. Methodik der Probenaufgaben auf Kapillarsäulen	90
8.1. Direkteinspritzung	90
8.2. Eingabe mittels Feststoffprobengeber	91
9. GC - Analyse aus von Vorstufen gewonnenen Aromafractionen auf Kapillarsäulen	91
10. Gaschromatographische Bestimmung der stickstoffhaltigen Substanzen	92
11. Kapillargaschromatographisch - massenspektrometrische Untersuchungen	94
12. Synthese von 3,3 - Dimethyl - 2 - hydroxy - butyrolacton	94
13. Isolierung und GC - Analyse von Aromafractionen aus unconchierten und conchierten Schokoladenmassen	95
14. Quantitative Bestimmung von 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - pyran - 4 - on	96

A A l l g e m e i n e r T e i l
=====

Einleitung

=====

1.1. Was ist Kakaoaroma ?

Aromastoffe sind wichtige Bestandteile der meisten Lebensmittel, da sie zum Genuß einer Nahrung anreizen und deren Bekömmlichkeit mit beeinflussen. Insbesondere ist für sogenannte Genußmittel wie Tee, Kaffee oder Kakao das Aroma ein wesentliches Qualitätsmerkmal, da es in seiner spezifischen Form maßgeblichen Anreiz zum Verzehr liefert. In der Literatur werden bis auf die Inertgase alle flüchtigen Inhaltsstoffe eines Lebensmittels als Aromastoffe bezeichnet, weil man annimmt, daß die meisten flüchtigen Bestandteile in Abhängigkeit von ihrem Schwellenwert eine Geruchsempfindung hervorrufen, oder, wenn sie geruchlos sind, auf riechende Komponenten einen Einfluß haben können. (1).

Die meisten Lebensmittelaromen, insbesondere jene, die ihre Entstehung einem technologischen Prozeß (z. B. dem Rösten) verdanken, haben einen äußerst komplexen Aufbau. Es ist jedoch nur ein Teil dieser Aromastoffe für das betreffende Lebensmittel spezifisch, während die übrigen Substanzen einen untypischen Aromaeindruck bilden, der aber für das Gesamtaroma durchaus von Wichtigkeit ist. Die weitgehende Kenntnis der qualitativen und quantitativen Aromazusammensetzung ist für viele Fragestellungen auf dem Gebiet der Lebensmittelchemie

und - technologie unerlässlich, wie z. B. bei der Klärung von Sortenunterschieden oder bei der Überwachung von technologischen Prozessen, die zu einer Aromabil - dung oder Aromaveredelung führen.

Die Bildung von Aromastoffen kann unter anderem durch Biogenese in den Zellstrukturen (z. B. bei Früchten), durch enzymatischen Abbau von nichtflüchtigen Inhaltsstoffen (z. B. bei Gemüsen) oder durch nichtenzymatische Bräunungsreaktionen, wie sie beim Kochen, Backen, Braten und Rösten ablaufen, erfolgen. (2). Diese Reaktion, die nach ihrem ersten Bearbeiter (3) auch als Maillard - Reaktion bezeichnet wird, bildet durch Um - setzungen von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen braune bis schwarz gefärbte hochmolekulare Stoffe, auch Melanoidine genannt, und flüchtige, bevorzugt heterozyklische Verbindungen, die oft sehr geruchsintensiv sind.

Für die Bildung des Kakaoaromas, das von blumigen, esterartigen über karamellig - nussige bis zu herben kakaotypischen Geruchsnoten reicht, sind zwei Prozesse notwendig, nämlich die Fermentation der Kakaobohnen in den Tropen und die Röstung unter definierten Tempera - tur - und Zeitbedingungen.

Die Bedeutung der Fermentation, bei der durch postmortale, in Kakaosamen einsetzende, enzymatisch gesteuerte Reaktionen die Aromavorstufen gebildet werden, zeigt

sich darin, daß bei der Röstung von unfermentierten Bohnen kein typisches Kakaoaroma entwickelt wird, während unzureichend fermentierter Kakao nach dieser thermischen Behandlung nur wenig Kakaoaroma aufweist.

Bei der Fermentation wird lediglich ein bestimmtes Aromavorstufenpotential in der Bohne ausgebildet, während das typische Aroma erst die Röstung zur Entfaltung bringt. Bei diesem für die Aromabildung entscheidenden technologischen Prozeß müssen bestimmte Temperatur - und Zeitbedingungen sehr genau eingehalten werden und der Ausgangswassergehalt in der Bohne möglichst niedrig sein, damit eine optimale Aromabildung gewährleistet ist. (4). Die beim Rösten kritische Temperatur schwankt je nach Sorte und Provenienz des Kakaos zwischen 115°C und 125°C und sollte nicht länger als vier bis fünf Minuten auf das Röstgut einwirken.

Während der Dauer der kritischen Temperatureinwirkung laufen Reaktionen ab, die zur Bildung der leicht-, mittel - und schwerflüchtigen Aromastoffe führen, aus denen sich der Gesamtkomplex zusammensetzt.

Versuche zur Aufklärung des Kakaoaromas sind seit 1912 im Gange, als Bainbridge und Davis (6) aus 2000 kg Kakaobohnen einen Aromaextrakt gewannen und diesen durch fraktionierte Destillation aufzutrennen versuchten. Inzwischen haben sich zahlreiche Autoren mit der Isolierung von flüchtigen Inhaltsstoffen des Kakaos befaßt

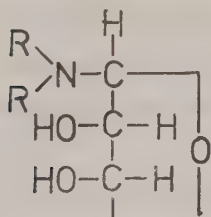
und bis jetzt 369 Substanzen im Kakaoaroma gefunden. Es ist jedoch noch nicht gelungen, diejenigen flüchtigen Verbindungen zu identifizieren, die den kakaotypischen Gesamteindruck hervorrufen. Neuerdings konnten Pickenhagen und Dietrich (7) das Prinzip des bitteren Geschmacks von geröstetem Kakao, der ja für den sensorischen Gesamteindruck wesentlich ist, identifizieren. Sie fanden, daß das typische Kakaoröstbitter durch eine Additionsverbindung von Theobromin mit Diketopiperazinen entsteht, die sich erst während der intensiven Röstung bilden.

1.2. Zur Bildung des Kakaoaromas

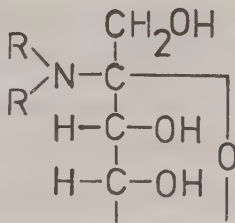
Wie vorher bereits erwähnt, ist eine Grundvoraussetzung für die Bildung eines kakaotypischen Aromas beim Rösten die Fermentation der Bohnen. Während dieses biologischen Prozesses verliert der Same unter Einfluß von Essigsäure und erhöhter Temperatur seine Keimfähigkeit, die subzelluläre Kompartimentierung wird zerstört und die Proteine und Disaccharide werden durch zelleigene Hydrolasen zu Peptiden, Aminosäuren und reduzierenden Zuckern abgebaut. Nach eingehenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß sich während des Röstvorgangs hauptsächlich diese drei Substanzgruppen verändern bzw. abgebaut werden und diese Verbindungen als die eigentlichen Aromavorstufen (precursor) anzusehen

sind. (8,9). Daraus kann geschlossen werden, daß die für die Aromabildung verantwortlichen chemischen Um - setzungen dem Typ der Maillard - Reaktion zuzuordnen sind. Die Meinung anderer Autoren, daß auch die Flavono - le an der Aromabildung beteiligt sind, (10), konnte in - zwischen widerlegt werden. (9). Da die Maillard - Re - aktion für die Kakaoaromabildung von ausschlaggebender Bedeutung ist, sollen die Grundzüge dieses Reaktions - typus - soweit bekannt - hier aufgezeigt werden.

Der erste Reaktionsschritt ist die Kondensation zwischen der Carbonylgruppe des reduzierenden Zuckers mit der Aminfunktion der Aminosäure oder des Peptides. Es bilden sich entsprechend der an der Reaktion betei - ligten Zucker entweder Aldosamine 1 oder Ketosamine 2, wobei die Aldosamine bei Säurekalkalyse unter Ama - doriumlagerung in 1 - Desoxy - 1 - amino - ketosen übergehen.



1

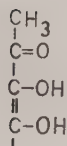
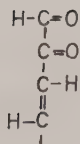
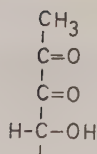
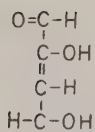
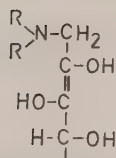
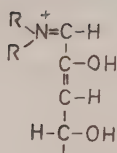
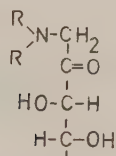
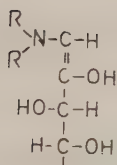
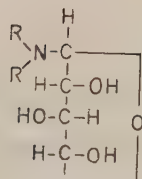


2

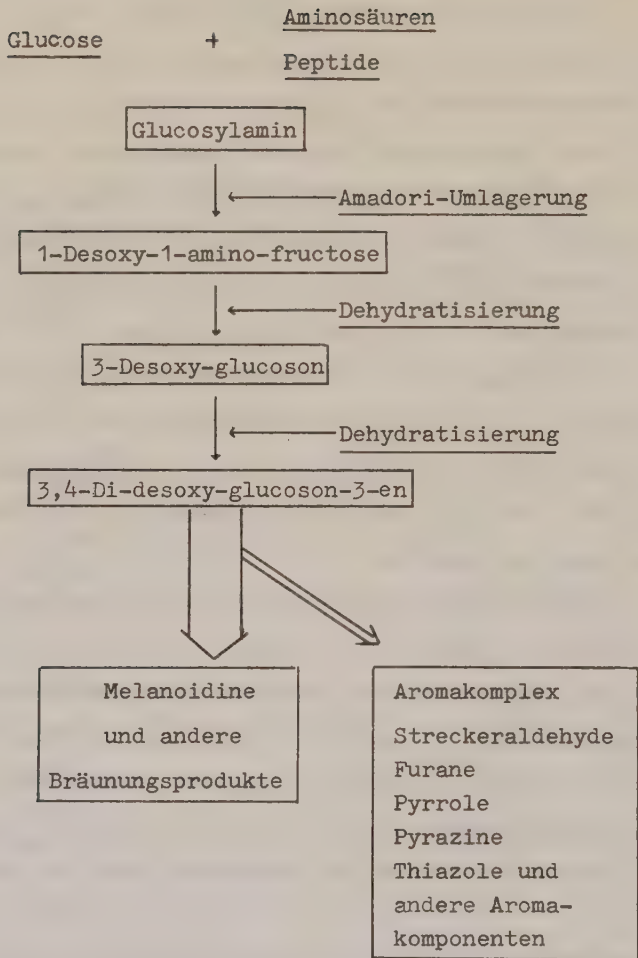
Die Ketosamine können sich entsprechend verhalten, indem sie nach einer Heyns - Carson - Umlagerung 2 - Desoxy - amino - aldosen bilden. Die Weiterreaktion des 1 - Desoxy - 1 - amino - ketosederivats kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Es entstehen nach einem oder mehreren Dehydratisierungsschritten gesättigte oder ungesättigte Oson, Verbindungen mit Reduktoncharakter und Spaltungsprodukte wie Diacetyl oder Methylglyoxal. (11). Das Schema (1) zeigt, von einem Aldosamin ausgehend, einige dieser möglichen Reaktionsabläufe.

Nach den Erkenntnissen von Landschreiber (12) läuft die Bildung des kakaotypischen Aromas nur nach einem der möglichen Seitenwege der Maillard - Reaktion ab und zwar über die Osonbildung. Andere mögliche Teilreaktionen über Reduktone oder Fragmentierungsprodukte sind diesen Untersuchungen zufolge nicht maßgebend. Weitere Reaktionsschritte sind der Abbau der Aminosäuren zu Aldehyden nach Strecker und die Bildung von Heterozyklen wie Furane, Pyrone, Pyrrole, Pyrazine und Thiazole. Das Schema (2) veranschaulicht die Vorstellungen dieses Autors über den Reaktionsablauf bei der Entstehung des spezifischen Kakaoaromas.

Neben dem Gesamtkomplex der bei der Fermentation gebildeten Aminosäuren spielen auch Peptide, die mit reduzierenden Zuckern in gleicher Weise reagieren wie die Aminosäuren, bei der Bildung des Kakaoaromas eine



Schema 1



Verlauf der Aromabildung bei Kakao
(von Glucose als Kohlenhydrat ausgehend)

Schema 2

entscheidende Rolle. Bereits Röhrle (9) konnte bei der Rekonstitution von Aromavorstufen feststellen, daß ein Gemisch von kakaoeigenen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern nicht ausreicht, um kakaospezifisches Aroma zu erzeugen. Landschreiber (12) gelang in der oben erwähnten Arbeit die Auftrennung der Vorstufen in Zucker, Aminosäuren und erstmals auch in Peptiden. Bei Rekombinationsversuchen stellte sich heraus, daß erst das Zusammenwirken sowohl der Aminosäuren, als auch der Peptide mit den Zuckern zur Aromabildung führt. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, daß die im Gemisch der aus Rohzucker isolierten Vorstufen enthaltenen nichtflüchtigen Säuren nicht zur Aromabildung beitragen.

1.3. Übersicht über Isolierungsmethoden
 anderer Autoren und bereits
 identifizierte Substanzen

Bis jetzt haben sich etwa 20 verschiedene Arbeitsgruppen mit der analytischen Erfassung des Kakaoaromas beschäftigt und unterschiedliche Vorstellungen über Verfahren der Extraktion und der Isolierung entwickelt, wobei die Art des Ausgangsmaterials sehr unterschiedlich war. Mit den Fortschritten auf dem Gebiet der Analysetechnik ergaben sich neue Möglichkeiten der Identifizierung.

Da Röhrle (9) und Landschreiber (12) bereits um -

fangreiche Übersichten über dieses Arbeitsgebiet vorgelegt haben, soll nur noch auf die Arbeit von Vitzthum et al (1975) (13) eingegangen werden, die in den oben genannten Berichten noch nicht beschrieben wurde. Es gelang dieser Arbeitsgruppe die Isolierung einer basischen Fraktion aus Kakaopulver, die sie nach Extraktion mittels überkritischem CO_2 gewonnen hatte, wobei 59 stickstoffhaltige Verbindungen (Oxazole, Pyridine, Pyrazine, Chinoxaline) identifiziert werden konnten, die bis dahin im Kakaoaroma noch nicht nachgewiesen waren.

Von den übrigen Publikationen sollen nur die einzelnen Arbeitsmethoden in einem kurzen Abriß aufgeführt werden.

Die Autoren untersuchten Aromakonzentrate, die rohen Kakaobohnen (14) (15) (16) oder dem abgepreßten Kakaofett gerösteter Bohnen (17) (18) entstammten. Vorwiegend wurden Aromastoffe jedoch aus gerösteten Kakaobohnen, Kernbruch oder Kakaomassen isoliert. (6, 14, 19, 20 - 30). Die Darstellungsverfahren waren Wasserdampfdestillation, (21) (26) (29), Codestillation mit Propylenglykol (20) oder Äthanol, Extraktion mit Hilfe verschiedener Lösungsmittel (15) (16) (19) (22) (25) (27) oder überkritischem CO_2 (13) und Isolierung mittels der Headspace - Technik. (14) (31). Die weitere Auftrennung in Fraktionen und Einzelsubstanzen erfolgte durch fraktionierte Destillation, papierchromatographisch

oder gaschromatographisch. Als Identifizierungsmethoden kamen Derivatbildung (15) (19), Papierchromatographie, (15) (20) (29), UV - und IR - Spektroskopie (19) (20) (21), Gaschromatographie und Massenspektrometrie zur Anwendung. (13) (17) (26).

Mit Hilfe dieser Methoden wurden bis jetzt 369 Aromastoffe im Kakao und in Kakaoerzeugnissen nachgewiesen. Sie lassen sich nach ihren funktionellen Gruppen in folgende Stoffgruppen unterteilen:

34	Kohlenwasserstoffe
28	Alkohole und Ketoalkohole
22	Aldehyde
25	Ketone
38	Säuren
7	Phenole
5	Äther
7	Acetale
53	Ester
9	Amine
6	Lactone
17	Furane
11	Pyrrole
73	Pyrazine
7	Pyridine
4	Oxazole
3	Chinoxaline
14	Schwefelverbindungen
6	Sonstige

Auffallend an dieser Liste ist der hohe Anteil an stickstoffhaltigen Verbindungen, insbesondere an Pyrazinen, die als Produkte der Maillard - Reaktion auftreten. Deshalb werden Pyrazine auch in gerösteten Produkten wie Kaffee oder Erdnüssen nachgewiesen. Da Pyrazine zum Teil sehr niedrige Geruchsschwellenwerte aufweisen, leisten sie zu den einzelnen Aromakomplexen einen wichtigen Beitrag. Es wurde bis jetzt jedoch noch kein Pyrazinderivat im Kakaoaroma gefunden, das den typischen Geruchseindruck von geröstetem Kakao wiedergibt. H. J. Takken et al (32) isolierte vier 2 - Dimethyl - aminoalkylpyrazine, deren Geruchsschwellenwerte er bestimmte und denen er Kakao-noten zuschrieb. Allerdings wurde keine dieser Verbindungen bis jetzt im Kakao nachgewiesen.

G. Reineccius et al (33) untersuchten die Faktoren, die die Konzentration von Pyrazinen in gerösteten Kakaobohnen beeinflussen, und fanden, daß der Gehalt an diesen Inhaltsstoffen sowohl von der Provenienz und damit auch von der Fermentierungsart, als auch von der Röstzeit abhängig ist.

Obwohl in der Aromastoffliste nur mit einer geringen Anzahl vertreten, soll kurz auf die Schwefelverbindungen hingewiesen werden, die besonders niedrige Geruchsschwellenwerte aufweisen und deshalb einen Aromakomplex in geringsten Mengen beeinflussen können.

Lopez und Quesnel (34) untersuchten die Einflüsse

von Schwefelverbindungen auf das Kakaoaroma, indem sie diese in geringen Mengen einem wäßrigen Kakaoextrakt zufügten. Die sensorische Analyse ergab, daß einige Mercaptane und Allylsulfide das Kakaoaroma verstärkten.

M. Stoll et al, (35), fanden in einer basischen Fraktion, die sie aus 270 kg Kakaomasse der Provenienz Arriba isoliert hatten und die einen stark nussigen Geruch aufwies, zwei schwefelhaltige Verbindungen. Es handelte sich um das geruchlose 4 - Methyl - 5 - (β - hydroxyäthyl) - thiazol und das Dehydratisierungsprodukt 4 - Methyl - 5 - vinyl - thiazol, das nur in Spuren vorhanden war, aber den stark nussigen Aromaeindruck hervorrief. Interessanterweise ergab die Rekombination der oben genannten basischen Fraktion mit der ebenfalls aus dem Aromakonzentrat isolierten Säurefraktion wieder typisches Kakaoaroma.

Den Aldehyden wird von verschiedenen Autoren ein wichtiger Beitrag zum Kakaoaromakomplex zugesprochen. Praag et al (26) isolierten neben anderen Aromakomponenten 5 - Methyl - 2 - phenyl - hex - 2 - enal und schrieben dieser Verbindung eine strenge - anhaltend bittere - Kakaonote zu. Dieser Befund konnte von Röhrle (1970) (9) und Lopez und Quesnel (1971) (36) nicht bestätigt werden. Nach deren sensorischer Beurteilung der Reinsubstanz weist diese eher süße und blumige Geruchsnoten auf.

Trotz der großen Anzahl von 369 nachgewiesenen Verbindungen ist es demnach noch nicht gelungen, diejenigen Substanzen und Substanzgruppen zu ermitteln, die für den kakaotypischen Gesamteindruck verantwortlich sind. Diese liegen offensichtlich in so geringen Mengen vor, daß sie mit den gängigen Analysemethoden nur sehr schwer erfaßt werden können. Ein Hauptgrund für die noch ausstehende Isolierung der kakaotypischen Aromastoffe dürfte sein, daß sie von einer Vielzahl unspezifischer Substanzen begleitet sind, die sich vom eigentlichen Aroma nur sehr schwer abtrennen lassen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der chemischen Natur der sensorisch aktiven, kakaotypischen Substanzen zu leisten, um damit Rückschlüsse auf die Entstehungsweise aus den Aromavorstufen und auf die hierbei ablaufenden aromabildenden Reaktionen ziehen zu können. Eine Erweiterung unserer Erkenntnisse hierüber würde wesentlich dazu beitragen, die Technologie der Kakaoverarbeitung auf eine gesicherte Basis zu stellen, um die auch heute noch nicht überwundene Empirie auf diesem Sektor ablösen zu können.

Zur Klärung dieses Problems sind folgende Vorüberlegungen notwendig:

1.) Es muß von einer Rohkakaoprovenienz ausgegangen werden, die nach der Röstung ein intensives typisches Kakaoaroma liefert.

2.) Da im Rohkakao bereits flüchtige, durch Biogenese entstandene Inhaltsstoffe vorhanden sind, und während der Röstung eine Vielzahl unspezifischer Röstbegleitstoffe entstehen, muß bei diesen Untersuchungen von den aus Rohkakao isolierten Vorstufen ausgegangen werden. Dadurch läßt sich einerseits eine Anreicherung der kakaotypischen Stoffe erzielen, andererseits die Konzentration von unspezifischen Begleitstoffen wesentlich verringern.

3.) Die Vorstufen müssen einem Erhitzungsprozeß (Rösten) unterworfen werden, bei dem das vorhandene Aromapotential optimal ausgenutzt wird.

4.) Die anschließende Isolierung der Aromastoffe muß so vorgenommen werden, daß eine Veränderung der bereits gebildeten kakaotypischen Aromasubstanzen weitgehend vermieden wird.

5.) Es müssen neue Trennverfahren angewendet oder entwickelt werden, die eine schonende Auftrennung in die Einzelsubstanzen gewährleisten.

6.) Es sind moderne Analysenverfahren anzuwenden, mit Hilfe deren es möglich ist, Einzelsubstanzen in geringsten Mengen zu erfassen.

In seiner Arbeit zeigt Röhrle (9) bereits Wege in dieser Richtung auf, indem er aus Rohkakao der Provenienz Ghana ein hochgereinigtes Vorstufengemisch gewinnt, das nach der Röstung intensives kakaotypisches Aroma ergibt. Durch Extraktion mit Äthanol und fraktionierter Hochvakuumdestillation des Extraktionsrückstandes konnte er eine mittelflüchtige und eine schwerflüchtige Aromafraktion isolieren, wobei der schwerflüchtige Anteil intensives Kakaoaroma aufwies. Die gaschromatographische Auftrennung auf einer gepackten Trennsäule ergab vier Hauptpeaks, denen sensorisch folgende Geruchsnoten zugeordnet wurden:

Reine Karamelnote - karamelig - herbe Kakaonote - nussig bis brenzlich.

Aufbauend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit wurden die weiteren Untersuchungen durchgeführt.

2. Darstellung der Aromastoffe =====

2.1. Isolierung und Behandlung der Vorstufen

Ausgangsmaterial für die Untersuchungen war Roh - kakaokernbruch der Provenienz Ghana, der aus einer Liefercharge stammte. Die Wahl fiel auf Ghanakakao, da dieser als guter Konsumkakao mit kräftigem Aroma bekannt ist. (37). Das Probenmaterial wurde bis zur Verarbeitung bei -20°C eingelagert. Bei dieser Temperatur treten im Rohkakaokernbruch selbst über einen längeren Zeitraum hinweg keine Veränderungen auf, so daß für die Untersuchungen stets gleiches Ausgangsmaterial zur Verfügung stand.

Die Darstellung der Aromavorstufen erfolgte in Anlehnung an die von Röhrle angegebene und von Landschreiber modifizierte Arbeitsweise. Da die Methode von den beiden Autoren ausführlich beschrieben wurde, sollen hier nur noch kurz die wichtigsten Arbeitsschritte und einige apparative Veränderungen erwähnt werden, die auf eine noch schonendere Vorstufengewinnung abzielen.

Die Vorstufen werden mittels eines Gemisches aus Methanol (3 Teile) und Wasser (1 Teil) mehrfach aus dem entfetteten Rohkakao extrahiert. Bei der Extraktion geht auch ein Teil der Kakaopolyhydroxyphenole mit in Lösung, die säulenchromatographisch abgetrennt werden müssen, da sie nicht zur Aromabildung beitragen. (9) Der bei dieser

Abtrennung störende Methanolanteil muß unter möglichst schonenden Bedingungen in einen Gehalt kleiner als 3 % reduziert werden. Da bei den früher verwendeten Destillationsverfahren (Rotationsverdampfer oder Dünnschichtverdampfer) entweder die Verweilzeit des Gutes in der Temperaturzone sehr lang und dadurch die thermische Belastung relativ hoch ist und darüberhinaus der erforderliche niedrige Methanolgehalt in einem Destillationsgang nicht erreicht werden kann, wurde nach einem Verfahren gesucht, bei dem in einem einzigen Durchgang mit kurzen Verweilzeiten im Verdampferraum die geforderte Grenzkonzentration an Methanol zu erzielen war. Als geeignet hierfür hat sich ein Kaskadenverdampfer *) erwiesen, dessen badbeheizte Böden maximale Verdampfungsgeschwindigkeit bei ausreichendem Durchsatz ermöglichen. Bei Verwendung dieser Destillationsapparatur wurde nach säulenchromatographischer Reinigung und Gefriertrocknung ein flockiges, nahezu farbloses Pulver gewonnen. Zur Kontrolle auf eine etwaige Schädigung dieses Produkts durch Bräunungsreaktionen wurde eine colorimetrische Bestimmung bei 420 nm angewandt.

Die Röstung des Vorstufengemisches und damit die Bildung des Kakaoaromas erfolgte unter Standardbedingungen.

(121° C / 10 min, Wassergehalt < 0,2 %) Hierzu wird

*) Hersteller: Otto Fritz GmbH, Hofheim /Taunus

das unter Phosphorpentoxyd im Exsikkator nachgetrocknete Präparat in dünner Schicht in einem "Sandwich" aus Aluminiumfolie (Dichtfaltung) entweder im Ofen eines Gas - chromatographen (4) mit Temperaturprogrammierung oder in einem speziell auf die kritische Temperatur eingestellten Trockenschrank erhitzt. Vergleichsröstungen mit anschließender sensorischer Analyse der Röstprodukte haben ergeben, daß beide Methoden hinsichtlich der erzielten Aromaqualität nahezu äquivalent sind. Die Anwendung des Trockenschanks ist bei größeren Mengen zu bevorzugen, wobei eine exakte Temperaturkontrolle über mehrere Thermoelement - Meßstellen, die zum Teil in das Röstgut eingebettet werden, gewährleistet sein muß. Auf diese Weise ist es möglich, in einem Arbeitsgang bis zu 50 g Vorstufengemisch optimal zu rösten. Das Röstprodukt ist infolge von Bräunungsreaktionen intensiv gefärbt und weist ein kakaotypisches Aroma auf. Ein großer Teil der leichtflüchtigen Verbindungen verflüchtigt sich während des Röstens und nach dem Öffnen des "Sandwiches." Das kakaotypische offensichtlich schwerflüchtige Aroma behält jedoch über längere Zeit seine sensorische Aktivität und verändert sich kaum.

2.2. Isolierung der Aromastoffe

Die gerösteten Vorstufen weisen infolge CO_2 - Entwicklung während des Röstens eine poröse, krümelige

Struktur auf. Setzt man das Röstprodukt höheren Luftfeuchtigkeiten aus, wirkt es als hygroskopischer Körper, nimmt Wasser auf und sintert zu einem klebrigen, leimartigen Produkt zusammen. Die Probe muß sofort nach der Röstung in einen Exsikkator übergeführt werden und ist aber dann unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit über Wochen haltbar. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die schwerflüchtigen kakaotypischen Aromastoffe in der zähflüssigen, fast harzartigen Melanoidinschicht eingebettet liegen und deshalb vor äußeren Einflüssen weitgehend geschützt sind. Diese für die Aromaerhaltung zwar positive Erscheinung erschwert jedoch die Isolierung der Aromastoffe. Die Darstellung einer kakaospzifischen Fraktion durch Hochvakuumdestillation des gerösteten Produkts ohne Vorbehandlung war trotz intensiver Bemühungen nicht möglich.

Zur Abtrennung der die Isolierung störenden Melanoidine wurde der bereits von Röhrle (9) vorgeschlagene Weg über die Extraktion der kakaotypischen Aromastoffe aus dem Reaktionsgemisch durch polare Lösungsmittel gewählt. Es hat sich insbesondere Äthanol als Extraktionsmittel gut bewährt, da einerseits die Aromastoffe quantitativ extrahiert werden, andererseits die störenden Begleitsubstanzen (Melanoidine, Purine) hierbei nur in relativ geringen Mengen (3 %) gelöst werden. Um einen Teil der Purine aus der Lösung zu entfernen, wurde eine Tiefkühl-

kristallisation bei -20°C vorgenommen, wobei der Hauptteil an Coffein ausfällt. Der auf diese Weise erhaltene äthanolische Extrakt enthält noch restliche Anteile an leichtflüchtigen Kakao-inhaltsstoffen, die zusammen mit dem Äthanol in einem Spitzkölbchen von 25 ml mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abdestilliert werden. Die Destillation ist so auszuführen, daß der zähe braune Rückstand in gleichmäßig dünner Schicht auf der Glasoberfläche des Kölbchens verteilt ist, um bei der anschließenden Hochvakuumdestillation eine maximale Ausbeute zu gewährleisten.

Zur Abtrennung der Aromafractionen aus dem oben erhaltenen Rückstand durch Hochvakuumdestillation wurde die von Röhrle benutzte Anlage weiter verbessert, so daß es möglich war, während des Destillationsvorganges einen Enddruck von 1×10^{-4} Torr (gemessen nach der ersten Kühlfalle) zu erreichen. Ein derart niedriger Druck ist notwendig, um einen maximalen Anteil an schwerflüchtigen Aromastoffen bei möglichst niedriger Badtemperatur isolieren zu können. Die Destillationsapparatur weist drei mit flüssigem Stickstoff gekühlte Tiefkühlfallen auf.

(S. Abb. 1):

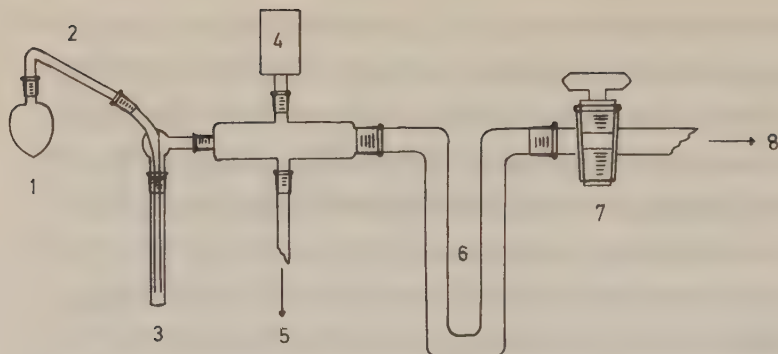


Abbildung 1

- | | |
|-------------------------|---|
| 1 = Probekölbchen | 5 = zum Vorvakuum |
| 2 = Destillationsbrücke | 6 = Kühlfalle 2 |
| 3 = Kühlfalle 1 | 7 = Hochvakuumhahn |
| 4 = Vakuummeßzelle | 8 = zu Kühlfalle 3 und
Öldiffusionspumpe |

Der erforderliche Arbeitsdruck kann über ein Präzisionseinlaßventil auf den jeweils gewünschten Enddruck eingestellt werden. Spuren von Treibmitteldampf (Öldiffusionspumpe) werden in einer vorgeschalteten Tiefkühlfalle (Falle 3) quantitativ zurückgehalten, so daß die Gefahr einer Verunreinigung des Hochvakuumkondensats ausgeschlossen ist.

Mit Hilfe dieser Anlage werden zunächst die noch im Rückstand enthaltenen Spuren von Lösungsmittel und leichtflüchtigen Substanzen bei 1×10^{-1} Torr abgetrennt und in der Kühlfalle 2 aufgefangen, die eine große Kapazität für kondensierbare Stoffe besitzt. Unmittelbar danach

wird Falle 1 ebenfalls mit flüssigem Stickstoff gekühlt und die Badtemperatur auf $+ 30^{\circ} \text{C}$ erhöht. Hierbei kondensieren sich in Falle 1 die im Rückstand enthaltenen Anteile mittlerer Flüchtigkeit, die einen fruchtigen, ananasartigen Geruch aufweisen. Anschließend erfolgt bei einer Badtemperatur von 60°C und einem Vakuum unter 1×10^{-3} Torr die Gewinnung der schwerflüchtigen Aromabestandteile aus dem vorentgasten Rückstand durch Destillation.

Um ein Maximum an Ausbeute zu erreichen, ist es wichtig, daß während des gesamten Destillationsvorganges die Kühlfallen nicht ausgetauscht werden, da hierbei das Vakuum aufgehoben werden müßte, wobei trotz Begasung mit N_2 der Zutritt von Luftsauerstoff - und feuchtigkeit unvermeidbar wäre, was unerwünschte Reaktionen zur Folge hätte. Darüberhinaus würden sich die während der Vorentgasung im Rückstand gebildeten Poren, die den Austritt der Aromastoffe erleichtern, wieder schließen, was erfahrungsgemäß zu einer Minderung der Ausbeute führt. Bei den vorgenannten Bedingungen kondensiert die schwerflüchtige Fraktion als stark kakaoaromatisches öliges Produkt in der Destillationsbrücke in Form feinsten Tröpfchen.

Die äußerst geringe Ausbeute ließ sich durch die bereits erwähnten methodischen Verbesserungen von anfänglich 12 ppm auf etwa das doppelte (bezogen auf

Kakaokernbruch) steigern. Die Entnahme des Destillats erfolgte erst nach Begasung der Anlage mittels nachgereinigtem Stickstoff, da es sehr zu oxidativen Veränderungen neigt, was zu einem teilweisen Verlust der Aromaspezifität führt. Das derart unter Sauerstoff - ausschluß entnommene Aromaöl wird mit Methanol in ein kleines Probengefäß überspült und mit Stickstoff begast. Die Lösung ist farblos und von intensivem karamellig - schokoladenartigem Geruch.

In hoher Verdünnung ist das Aromaöl bei -20°C einige Wochen haltbar. Entfernt man das Lösungsmittel durch Abblasen mit Stickstoff, so tritt sehr rasch Braunfärbung und eine Veränderung der sensorischen Merkmale des Aromastoffgemisches auf.

3. Versuche zur Auftrennung =====

der Aromafraktionen =====

3.1. Versuche zur Vorfraktionierung

Zur Charakterisierung und Fraktionierung des komplexen Aromastoffgemisches wurde zunächst eine dünn - schichtchromatographische Trennung auf Celluloseplatten versucht. Mit Kieselgel als Sorptionsmittel beschichtete Platten erwiesen sich als ungeeignet, da nach dem Auftragen des Aromaöls die sensorische Aktivität der Substanz verloren ging. Dagegen konnte auf cellulosebeschichteten Platten mit einem Laufmittelgemisch Dichlormethan / Acetonitril eine Auftrennung in drei Substanzzonen erzielt werden. Zwei dieser drei Zonen ließen sich mit Jod und Dichlorfluorescein anfärben, was auf Verbindungen mit ungesättigtem Charakter und mit Carbonylfunktion schließen läßt. Nach dem Herausnehmen der Platten aus der Chromatographiewanne und dem Abdampfen des Elutionsmittels veränderten sich die karamelligen Geruchsnoten sehr rasch. Wurden die DC - Chromatogramme zwecks Lokalisierung von Substanzzonen mit UV - Adsorption dem UV - Licht (254 nm) ausgesetzt, waren keinerlei spezifische Aromanoten mehr zu erkennen. Bei gaschromatischer Überprüfung der getrennten Zonen stellte sich heraus, daß tiefgreifende Umsetzungen der einzelnen Substanzen erfolgt waren. Die

D ü n n s c h i c h c h r o m a t o g r a p h i e
war demzufolge zur Vortrennung n i c h t geeignet.

Aus diesem Grunde wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die geringen Mengen Aromaöl auf eine schonende Weise weiter vorfraktionieren zu können. Da zu erwarten war, daß bei papierchromatographischen oder säulenchromatographischen Methoden ähnliche, negative Effekte wie bei der Dünnschichtchromatographie auftreten, wurde eine neue Technik eingesetzt, die sich zur Auftrennung geringster Stoffmengen mit anschließender Isolierung eignet. Verwendung fand ein

H o r i z o n t a l d e s t i l l a t o r
der Firma Fischer. (38). Mit diesem Gerät lassen sich Stoffgemische von 1 - 100 mg destillativ in ihre Komponenten bzw. in mehrere Fraktionen zerlegen.

Zur Erklärung der Funktionsweise soll kurz der Aufbau der Apparatur beschrieben werden: Das Gerät besteht aus der Kapillarkolonnen - einem Glasrohr (Länge 120 cm) Außendurchmesser 0,5 cm, Innendurchmesser 0,3 cm) - dem Heizofen, der über dem Rohr horizontal mit einer bestimmten Vorschubgeschwindigkeit verschiebbar ist und somit ein beliebiger Temperaturgradient sich einstellen läßt, wozu ein elektronischer Regler Teil dient. Aus Abbildung (2) geht der schematische Aufbau der Geräteanordnung hervor.

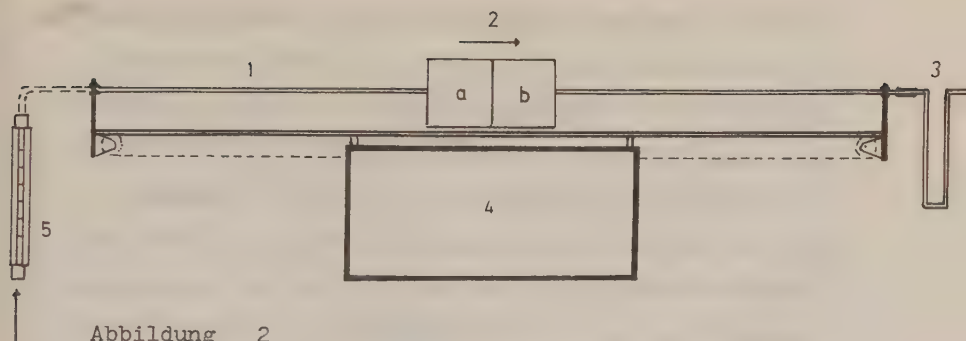


Abbildung 2

- 1 = Kapillarkolonne
- 2 = Gradientenofen: a) Heizteil b) Kühlteil
- 3 = Kühlfalle
- 4 = Reglerteil mit Ofenvorschub
- 5 = Stickstoff-Strömungsregler

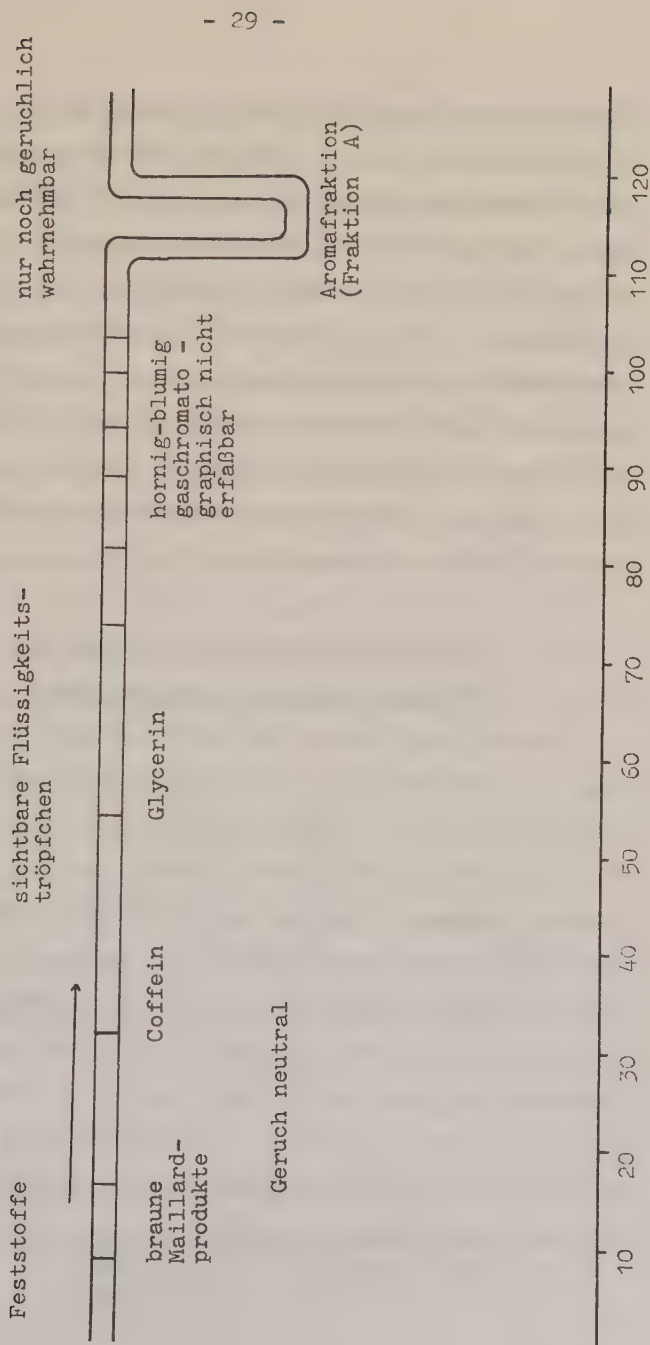
Arbeitsweise:

Zur Vorfraktionierung des schwerflüchtigen Aromastoffgemisches wird eine geringe Menge der methanolischen Lösung (etwa 0,02 g Substanzgemisch) am linken Ende der Kapillarkolonne mit Hilfe einer speziell dafür konstruierten Glaspipette so abgefüllt, daß sich die gesamte Substanzmenge 10 cm vom Ende entfernt in Form eines Tropfens befindet. Mit der Destillation wird erst begonnen, nachdem mit Hilfe eines Stickstoffstromes (20 ml/min) das überschüssige Methanol bei Zimmertemperatur entfernt ist. Der Gasstrom muß während des gesamten weiteren Destillationsvorganges aufrechterhalten

bleiben. Über den lösungsmittelfreien Substanztropfen im Rohr schiebt man sodann den Gradientenofen und erhitzt, bis die flüchtigen Bestandteile zu destillieren beginnen. Als optimales Wärmegefälle im Ofen hat sich zu Beginn der Destillation 150°C zu 100°C erwiesen. Beim Einstellen dieser Temperaturdifferenz wandern die leichter flüchtigen Bestandteile weiter in Richtung des Wärmegefälles als die schwerflüchtigen. Der Ofen wird langsam zentimeterweise über das Glasrohr in Richtung des Gasstromes geschoben, wobei die schwerflüchtigen Bestandteile mehrfach verdampft und rekondensiert werden. Mit fortschreitender Destillation kühlt man den Ofen ab, sodaß der Wärmegradient zunächst auf 130°C zu 80°C und dann auf 100°C zu 50°C sinkt, wobei sich die einzelnen Komponenten entsprechend ihrer Siedepunkte an der Glaswand niederschlagen. In der am Ende des Rohres befindlichen, mit flüssigem Stickstoff gekühlten Falle werden die leichter flüchtigen Anteile aufgefangen. In Abbildung (3) ist eine schematische Darstellung der Auftrennung in der Kapillarkolonie wiedergegeben.

Zur weiteren Charakterisierung der aufgetrennten Aromafaktionen wird das Glasrohr in etwa 5 cm lange Stücke zerschnitten und die einzelnen Abschnitte zunächst auf ihren Gehalt an Geruchsstoffen sensorisch untersucht. Die kakaospezifischen Substanzen waren vorwiegend am rechten Ende des Glasrohres und in der Tiefkühlfalle

Abbildung 3: Auftrennung in der Kapillarkolonne



nachzuweisen. Obwohl die Geruchsintensität der sensorisch aktiven Fraktionen sehr hoch war, konnten sie zum Teil nicht einmal mit einer Lupe wahrgenommen werden. Die auf diese Weise gewonnenen Substanzmengen waren daher äußerst gering. Die verschiedenen Fraktionen wurden mit Methanol aufgenommen, wobei die Wandadsorption der geruchssintensiven Substanzen an der Glasoberfläche so stark war, daß sie selbst nach mehrmaligem Nachspülen mit Lösungsmitteln sensorisch noch nachzuweisen waren. Auf die weiteren, mit Hilfe der Gaschromatographie durchgeführten Untersuchungen wird später eingegangen.

3.2. Versuche zur gaschromatographischen Auftrennung auf gepackten Säulen

Im weiteren Verlauf der Arbeit ging es in erster Linie um eine optimale Auftrennung der einzelnen Aromafaktionen in ihre Einzelsubstanzen als Voraussetzung für eine erfolgversprechende Identifizierung. Wegen der bereits erwähnten Neigung zu oxidativen Veränderungen und Kondensationsreaktionen und der geringen zur Verfügung stehenden Mengen war eine weitere Auftrennung der einzelnen Aromafaktionen nur mit Hilfe der Gaschromatographie möglich. Als Trennsäulen wurden zunächst gepackte Glassäulen verwendet. Zur Untersuchung gelangten nur die bei der Hochvakuumdestillation gewonnenen mittel- und schwerflüchtigen Fraktionen. Die mit Hilfe der Hori-

zontaldestillationsanlage erhaltenen Aromaanteile wurden auf gepackten Säulen nicht untersucht, da dieses Gerät zum damaligen Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand. Bei den in hochverdünnten Lösungen vorliegenden Aroma - fraktionen mußte vor der gaschromatographischen Analyse der Lösungsmittelanteil durch Begasen mit Stickstoff auf schonende Weise möglichst weitgehend reduziert werden.

Zur Auftrennung erschien zunächst eine stationäre Phase mit Polyäthylenglykolsuccinat (E G S) in 2,5 % - iger Belegung auf Chromosorb G besonders geeignet. Bei einem programmierten Temperaturanstieg von 90°C bis 180°C mit einer Aufheizrate von $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ erhält man bei der Analyse des schwerflüchtigen Anteils ein Chromatogramm mit 5 Hauptpeaks und mehreren kleineren Peaks. (Abbildung 4).

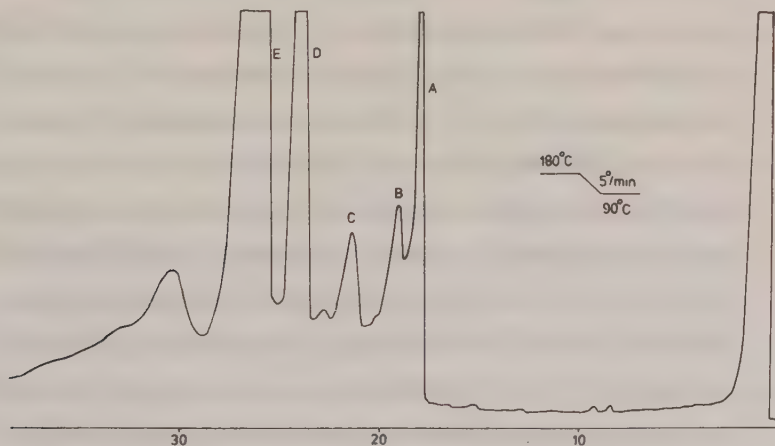


Abbildung 4: Gaschromatogramm einer schwerflüchtigen Aromafraktion (Auftrennung auf einer gepackten EGS - Säule)

Bei anschließender massenspektrometrischer Untersuchung stellte sich jedoch heraus, daß die Trennung unvollständig war. Lediglich ein Substanzpeak (D) war gaschromatographisch rein, so daß eine MS - Identifizierung möglich war. Es handelte sich um 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on,

Bei der gaschromatographischen Untersuchung der mittelflüchtigen Bestandteile erhält man einen Hauptpeak, der als Essigsäure identifiziert werden konnte, und zwei Peaks mit den Retentionszeiten 7,8 und 8,4, die zwei identische Massenspektrogramme ergaben und beide als 2,3 - Butandiol identifiziert werden konnten, das im flüssigen Zustand als Gemisch aus Threo - und Erythroform vorliegt.

Versuche, durch Austausch der EGS - Säule gegen eine Carbowax - 20 m - Säule die Trennung insbesondere des schwerflüchtigen Aromas zu verbessern, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Dagegen konnten mit Hilfe der Trennphase F F A P in 10 % iger Belegung auf Chromosorb G zwei schwerflüchtige Verbindungen aus dem Aromastoffgemisch abgetrennt werden. Es handelte sich einerseits um Coffein, das bei der Hochvakuumdestillation bei 10^{-3} Torr bereits mit in das Destillat übergeht und somit das Aromaöl verunreinigt, andererseits um Phenyl - essigsäure. Da die fünf auf gepackten Säulen isolierten und danach massenspektrometrisch identifizierten Substanzen im Kapitel 4 bei der kapillargaschromatographisch-

-massenspektrometrischen Identifizierung der einzelnen Fraktionen genau beschrieben werden, soll an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

Versuche, die übrigen Verbindungen des aromaspezifischen Stoffgemisches auf gaschromatographisch - präparativem Weg vorzutrennen und dann auf verschiedenen Trennsäulen die einzelnen Fraktionen weiter zu differenzieren, schlugen fehl, da bereits während der Kondensation in den gekühlten Probenröhrchen über längere Zeiträume Veränderungen auftraten.

3.3. Trennung auf Kapillarsäulen

3.3.1. Optimierung des Trenneffektes

Nachdem die Auftrennung der einzelnen Aromafraktionen auf gepackten Säulen unvollständig war und eine Isolierung der enthaltenen Einzelsubstanzen nicht erreicht werden konnte, war es notwendig, von gepackten Säulen auf Kapillarsäulen überzugehen. Zur Anwendung kamen Dünnschichtkapillarglassäulen, die einerseits eine hohe Trennleistung aufweisen und bei denen andererseits mögliche katalytische Effekte - wie sie bei Metallsäulen auftreten - ausgeschlossen sind. Ein entscheidender Vorteil von Kapillarsäulen ist, daß bei Anwendung von geeigneten Techniken hochverdünnte Lösungen analysiert werden können. (39). Damit lassen sich auch die mit Lösungsmit-

teln aufgenommenen vorliegenden Aromafraktionen auf direktem Weg ohne Anreicherung und damit weitgehend unverändert bestimmen. Selbst die schonendsten Methoden zur Lösungsmittelentfernung bewirken unspezifische Reaktionen im Aromastoffgemisch.

Die Nachteile der Glaskapillarsäulen sind mangelnde Thermostabilität und Empfindlichkeit gegenüber polaren Lösungsmitteln. (40). Wie die Untersuchungen zeigten, sind die aufzutrennenden Aromafraktionen in unpolaren Lösungsmitteln nicht löslich, weshalb mit Schwierigkeiten zu rechnen war.

Die Verwendung der Kapillarsäulen erforderte ein Umrüsten des vorhandenen Gaschromatographiegerätes, um die Voraussetzungen für möglichst optimale Trennungen zu schaffen. Als Einspritztechnik fand anfangs das Splitssystem nach Grob (39) Verwendung, das gegenüber den herkömmlichen Strömungsteilersystemen für das vorliegende Problem folgende Vorteile bringt:

- 1.) die Einspritzung erfolgt verlustfrei
- 2.) es können stark verdünnte Proben verwendet werden
- 3.) bei normalen Splitsystemen muß die Verdampfung der Probe äußerst rasch erfolgen, da sonst zu starke Tail - Effekte auftreten. Bei dieser Methodik fällt die Notwendigkeit der raschen Verdampfung weg, da sich die aufzutrennenden Substanzen am Anfang der Säule innerhalb einer kurzen Zone aufkonzentrieren. Die relativ langsame

Verdampfung erlaubt eine wesentliche Senkung der Verdampfertemperatur, was zu einer erheblichen Reduzierung der thermischen Beanspruchung hitzeempfindlicher Substanzen führt.

Bedingt durch die notwendig hohe Verdünnung des Aromastoffgemisches muß allerdings in einem sehr hohen Empfindlichkeitsbereich des FID - Detektors gearbeitet werden. Die daraus resultierenden negativen Einflüsse des Septums (Bleeding und teilweise Adsorption von Lösungsmitteldampf) bei der angewandten Injektor-temperatur (225°C) auf die Qualität der Analyse konnten durch Verwendung einer modifizierten Halterung für das Septum des Einspritzblocks eliminiert werden. Aufgrund dieser Vorrichtung wird die Temperatur des Septums niedrig gehalten und die Rückdiffusion von Lösungsmitteldämpfen weitgehend ausgeschaltet.

Mit Hilfe der beschriebenen Anordnung lassen sich gute und reproduzierbare Trennungen erzielen. Ein Nachteil ist, daß bei dieser Eingabemethode die Säulen mit großen Mengen polarer Lösungsmittel belastet werden. Die Erfahrung zeigte, daß bei den verwendeten Säulen sich bereits nach 30 Einspritzungen von in Methanol gelösten Aromastoffen der dünne Trennfilm von der Glasoberfläche der Säule ablöste, was zu einer sofortigen Verschlechterung der Trennleistung führte und damit die Säule unbrauchbar wurde.

Deshalb wurde die oben beschriebene Arbeitsweise nur angewandt, wenn diese unumgänglich erschien. Um eine Schädigung der Säulen durch das verwendete Lösungsmittel zu umgehen, wurde bei der Analyse des schwerflüchtigen Anteils nach einer Möglichkeit gesucht, das Lösungsmittel bereits außerhalb des Gaschromatographen auf eine möglichst schonende Weise zu entfernen und danach erst die aufzutrennende Substanz in den Gaschromatographen einzugeben. Als eine tragbare Lösung hierfür erwies sich die Verwendung eines Feststoffprobegebers anstelle des normalen Einspritzblocks. Dazu wird die Probe in methanolischer Lösung auf ein kleines Glaskapillarstück aufgegeben und das Lösungsmittel über Stickstoff bei Zimmertemperatur abgedampft. Sodann wird das mit der lösungsmittelfreien Substanz in sehr dünner Schicht beladene Kapillarröhrchen unter Ausschluß von Luftsauerstoff über den Feststoffprobegeber in den Injektorteil des Gaschromatographen eingebracht. Für die optimale Trennung der zu untersuchenden Substanz ist es wichtig, daß die Verdampfung der Probe direkt über dem Säulenende einsetzt, da sonst Verwirbelungen des Dampfpfropfens im Verdampferteil auftreten, was die Trennung nachteilig beeinflußt.

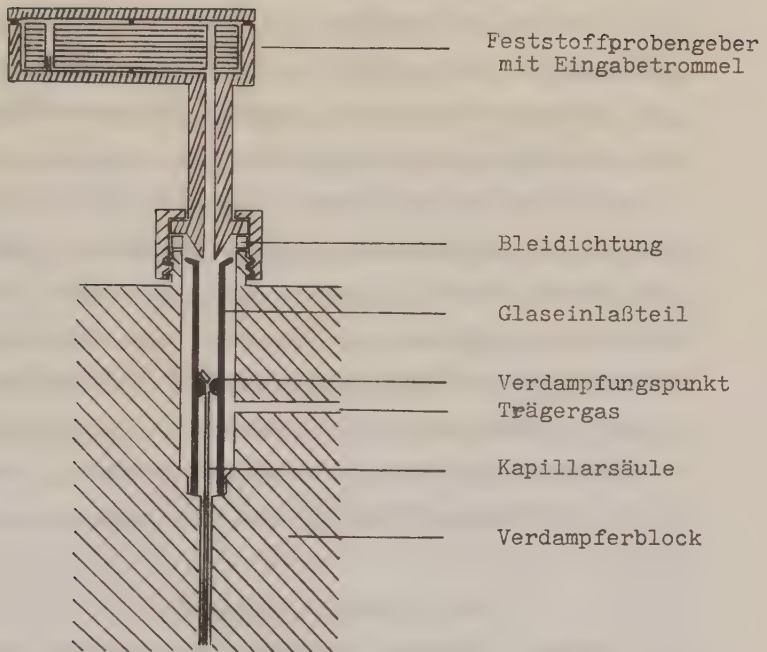


Abbildung 5: Eingabesystem mit Feststoffprobengeber

Abbildung (5) zeigt die gesamte Eingabevorrichtung mit dem speziellen Glaseinlaßteil, das obige Voraussetzung erfüllt. Sämtliche im System verwendeten Glas-
teile wurden vor dem Einsatz silanisiert, um Adsorptions-
effekten an polaren Stellen der Glasoberfläche vorzu-
beugen.

Das Eingabesystem mittels Feststoffprobengeber war nicht nur die schonendste Art der Probenzuführung, sondern ergab auch im Vergleich zur vorherigen eine bessere gaschromatographische Trennung. Es konnte jedoch nur bei der gaschromatographischen Analyse der schwerflüchtigen Aromaanteile eingesetzt werden. Die Auftrennung der mittelflüchtigen Fraktionen mußte mit Hilfe des oben beschriebenen Einspritzsystems nach "Grob" erfolgen, da bei der Abtrennung des Lösungsmittels große Aromastoffverluste auftraten. Auch bei der gaschromatographisch - massenspektrometrischen Analyse konnte das Feststoffprobengebersystem nicht verwendet werden, da die bisher verfügbaren Geräte hierzu nicht geeignet sind.

3.3.2. Versuche zur Trennung

Um die Auftrennung der Aromafractionen in ihre Einzelsubstanzen zu ermöglichen, wurden die ersten Trennversuche mit Trennphasen unterschiedlicher Polarität vorgenommen. Von den Säulen mit den Trennphasen FFAP (20 m und 50 m), Ucon 5100 (20 m) und OV 101 (50 m) erwies sich die FFAP - Säule (20 m) als die brauchbarste. Es hat sich bei allen Trennversuchen gezeigt, daß eine Säulenlänge von etwa 20 m bei der Lösung der vorliegenden Trennprobleme optimal ist. Schwerflüchtige polare Stoffe werden bei langen Säulen zu stark adsorbiert, Die Meßdauer verlängert sich um ein Vielfaches und die Peaks

erhalten eine breite Form oder verschwinden ganz. Mit Hilfe einer FFAP - Säule von 20 m Länge wird das schwerflüchtige Aromaöl in sechs Hauptpeaks und eine Vielzahl kleinerer Nebenpeaks aufgetrennt. Ein spezieller Peak, der sich nach gaschromatographischer Analyse durch Vergleich mit Reinsubstanzen als Phenylelessigsäure erwies, wirkte sich im Chromatogramm störend aus, weil er infolge eines sehr ausgeprägten Tailings die anderen Verbindungen überdeckt. Versuche, die Phenylelessigsäure über das Natriumsalz bzw. einen basischen Ionenaustauscher (Amberlite IR - 4 b) zu eliminieren, schlugen fehl, weil sich hierbei insbesondere Schwierigkeiten durch Aufnahme von Fremdsubstanzen aus dem Austauscherharz ergaben, die in ihrer Konzentration mit den zu untersuchenden Verbindungen vergleichbar waren.

All diese Schwierigkeiten konnten mit dem Einsatz einer Zweiphasen - Trennsäule vom Typ WG 11 (Fa. Günther) umgangen werden. Die Belegung dieser Säule besteht aus einem Gemisch von Polyäthylenglykol und Terephthal - säure. (Länge 20 m). Mit Hilfe dieser Säule konnten die Aromafractionen in ihre Einzelsubstanzen aufgetrennt und selbst die Phenylelessigsäure so abgetrennt werden, daß sie sich nicht mehr störend auf die Gesamt - trennung auswirkte.

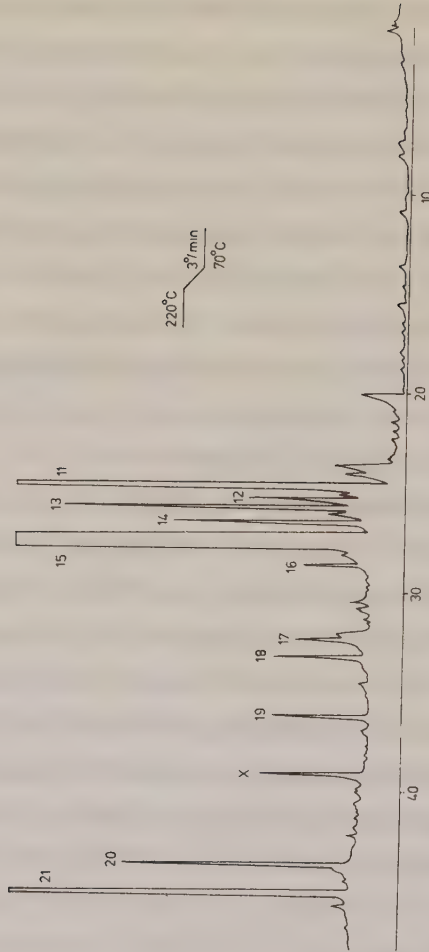


Abbildung 6

Gaschromatogramm einer schwerflüchtigen Aromafraktion
Auftrennung auf einer Dünnschichtglassäule vom Typ WG 11

Wie sich aus den entsprechenden Versuchen ergab, weist das Gaschromatogramm des bei der Hochvakuumdestillation gewonnenen schwerflüchtigen Aromaöls zwölf Hauptpeaks auf.

Eine optimale Trennung des schwerflüchtigen Aromaöls ließ sich mit einem Temperaturprogramm von 70°C - 220°C bei einer Aufheizrate von $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und einem Gasdurchfluß von $3\text{ ml}/\text{min}$ erzielen. Einzelheiten über die GC - Bedingungen bei der Analyse der anderen Fraktionen sind dem methodischen Teil zu entnehmen.

Als Trägergas fand Wasserstoff Verwendung, was besonders bei der Auftrennung von schwerflüchtigen Verbindungen entscheidende Vorteile mit sich bringt. Wasserstoff weist von allen möglichen Trägergasen die niedrigste Viskosität auf. Es ist dadurch möglich, schwerflüchtige Substanzen mit hoher Tendenz zur Adsorption am Trägermaterial zu eluieren, die bei Verwendung von Helium auf der Säule verbleiben würden. Ein weiterer Vorteil beim Betrieb mit Wasserstoff ist die im Gegensatz zu Helium um etwa die Hälfte verminderte Meßdauer .

3.4. Bestimmung der stickstoffhaltigen Substanzen mittels stickstoffselektivem Detektor

Um eine erste Vorstellung über die chemische Zusammensetzung der Aromafraktion zu bekommen, wurden gaschromatographische Analysen mit einem stickstoffselektiven

Detektor durchgeführt. Zur Anwendung kam ein thermo - ionischer Phosphor - Stickstoff - Detektor, bei dem es sich im wesentlichen um einen modifizierten F I D handelt. In der Flamme eines F I D ist eine einstellbare Alkaliquelle angeordnet, die sich auf negativem Potential befindet. Beim Auftreten von stickstoffhaltigen Komponenten findet eine thermo-ionische Reaktion statt, bei der weitere Ionen frei werden. Diese werden von der positiv geladenen Elektrode eingefangen und liefern das verstärkte Signal. Der in diesem Detektor eingebaute Alkalisalz - Kristall (KCL) gibt eine Selektivität von 5×10^3 : 1 für stickstoffhaltige Verbindungen im Vergleich zu normalen Kohlenwasserstoffen. (42). Mit Hilfe dieses Detektors waren Informationen zu erhalten, welche Einzelkomponenten Stickstoff aufweisen, was bei der Auswertung der einzelnen Massenspektren von besonderer Bedeutung war.

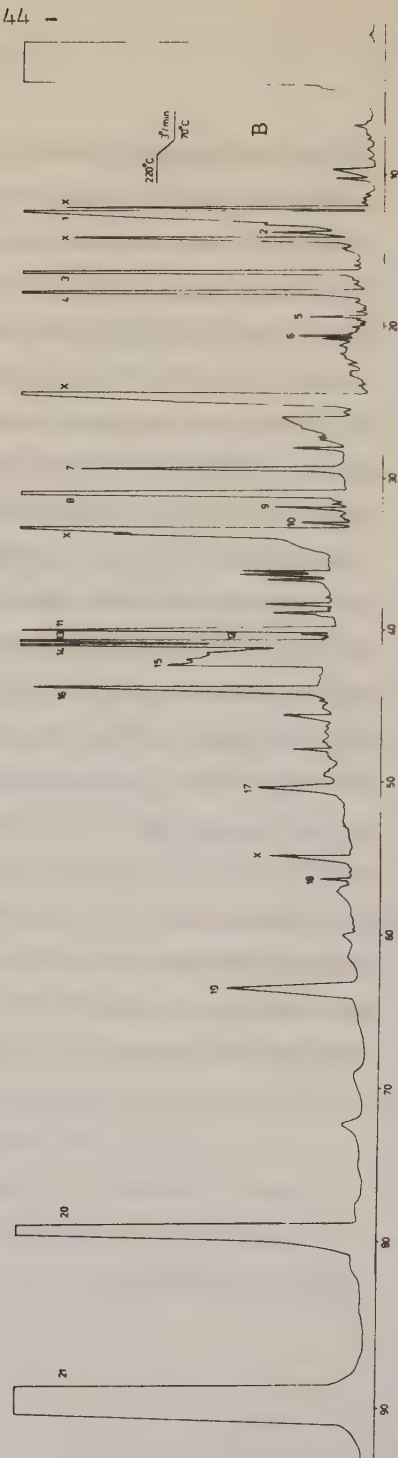
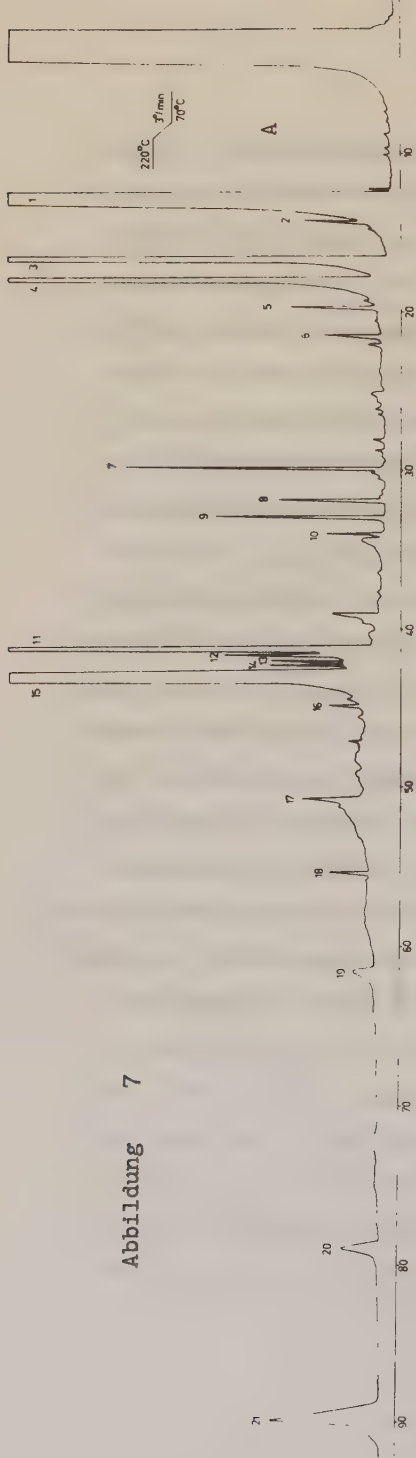
Voraussetzung für die Analyse der Stickstoffverbindungen ist eine optimale Einjustierung des Salzkristalls im Detektor. Um eventuelle Abweichungen in der Konstanz der Meßbedingungen zu erkennen, wurde ein Testgemisch, bestehend aus Valerolacton und Pyridin, eingespritzt und auf quantitative Veränderungen überprüft.

Zur Analyse der Stickstoffverbindungen wurden je Fraktion zwei gaschromatographische Untersuchungen vorgenommen. Bei Analyse 1 wurde der Detektor auf höchste

Stickstoffempfindlichkeit eingestellt, wobei die Signale stickstoffhaltiger Verbindungen im Verhältnis $1 : 5 \times 10^3$ verstärkt waren. Sodann wurde der stickstoffselektive Detektor gegen einen normalen F I D ausgetauscht und das Aromastoffgemisch nochmals gemessen. Durch quantitativen Vergleich der einzelnen Signale lassen sich die Stickstoffverbindungen erkennen. Abbildung (7) zeigt die beiden Gaschromatogramme einer Probe, bestehend aus der vereinigten mittel - und schwerflüchtigen Aromafraktion aus einem gerösteten Vorstufengemisch.

Da bei Anwendung des stickstoffselektiven Detektors Helium statt Wasserstoff als Trägergas verwendet werden mußte, sind hier im Vergleich zu dem in Abbildung (6) gezeigten Gaschromatogramm eine etwas schlechtere Trennung und verdoppelte Meßzeiten zu beobachten. Die Peaks 8, 13, 14, 19, 20, 21, zeigten verstärkte Signale und sind demnach stickstoffhaltigen Substanzen zuzuordnen. Bei den angekreuzten Peaks handelt es sich um stickstoffhaltige Substanzen, die in sehr geringen Mengen im Aromastoffgemisch vorliegen und vom F I D - Detektor kaum mehr erfaßt werden.

Abbildung 7



Gaschromatogramm einer Aromafraktion bestehend aus mittel - und schwer flüchtigen Bestandteilen
 A unter Verwendung eines F I D Detektors
 B unter Verwendung eines stickstoffselektiven Detektors

4. Massenspektrometrische Identifizierungs-
versuche nach kapillargaschromatographischer
Auftrennung

Die weitere Untersuchung der auf kapillargaschromatographischem Weg aufgetrennten Substanzen erfolgte mit Hilfe einer Gerätekombination Kapillargaschromatograph - Massenspektrometer. Die Identifizierung ließ sich nur auf dem Weg über die Massenspektrometrie erreichen, da alle anderen physikalisch-chemischen Methoden nicht genügend empfindlich sind, um brauchbare Informationen zu liefern und eine Anreicherung der isolierten Einzelsubstanzen aus oben beschriebenen Gründen nicht möglich war.

4.1. Analyse der mittelflüchtigen Fraktion

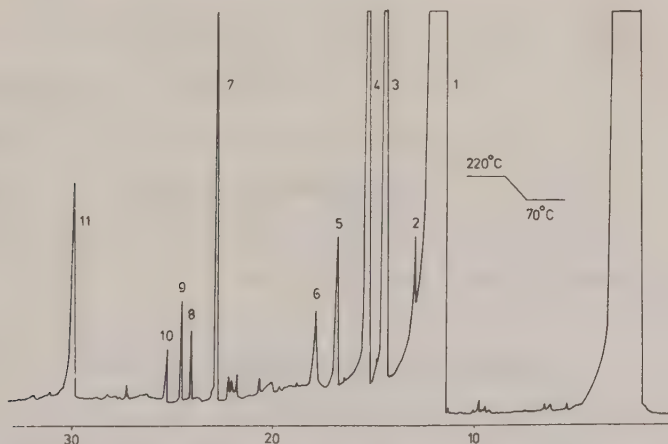
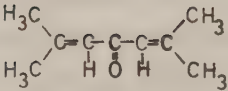
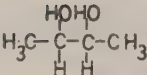
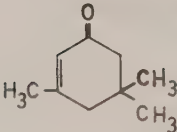
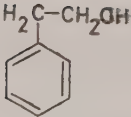
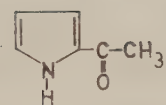
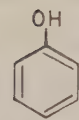
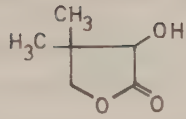
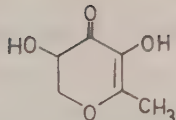


Abbildung 8: Gaschromatogramm einer mittelflücht. Fraktion
Auftrennung an einer Dünnschichtglaskapillarsäule
vom Typ W G 11

T a b e l l e 1
=====

		A	B	C	D
1	<chem>CH3COOH</chem>	60(65), 45(94), 43(100)	47	+	i.H.
2		138(6), 123(100), 108(15) 95(23), 83(19), 67(18) 55(56), 53(49)	-		i.H.
3/4		90(15), 75(40), 57(90) 55(30), 45(100), 44(85) 29(50)	47	+	i.H.
5		138(16), 123(2), 95(8) 91(3), 82(100), 67(9) 55(12), 54(24), 41(12)	46	-	i.H.
6		86(28), 85(15), 56(27) 45(23), 42(100), 41(32) 31(50), 28(75)	47	+	i.H.
7		122(29), 92(63), 91(100) 77(13), 65(29), 51(16)	47	+	i.H.

		A	B	C	D
8		109(73), 94(100), 66(64) 43(12)	43	+	i.H.
9		94(100), 66(15), 65(10)	47	+	i.H.
10		73(8), 72(13), 71(100) 68(8), 57(25), 56(8) 55(11), 53(10), 43(45)	48	-	S.
11		144(100), 115(6), 101(85) 73(51), 72(76), 55(92) 43(95)	52	-	

Zur Erläuterung der Tabelle:

Spalte A: Massenspektrum der Verbindung

Spalte B: M S - Literatur

Spalte C: (+) = im Kakaoaroma nachgewiesen

(-) = bis jetzt noch nicht nachgewiesen

Spalte D: Vergleichssubstanzen:

i.H. = im Handel erhältlich

S. = synthetisiert

Die kapillargaschromatographische Auftrennung der bei der Hochvakuumdestillation erhaltenen Anteile mittlerer Flüchtigkeit ergab ein Chromatogramm, das 11 Haupt - peaks aufweist. (Abbildung 8). In Tabelle (1) sind die identifizierten Verbindungen aufgeführt. Die mittelflüchtige Fraktion besitzt neben einem stark sauren Geruch, der vorwiegend der Essigsäure zuzuordnen ist, fruchtige Geruchsnoten. Eine der dafür verantwortlichen Verbindungen sitzt auf dem Tailing des Essigsäurepeaks. Auffallend am Massenspektrogramm der Verbindung, deren Molekülion die Masse $\frac{m}{e}$ 138 aufweist, ist die starke Abspaltung von $M - 15$ zum Basispeak $\frac{m}{e}$ 123 und die davon ausgehende Eliminierung einer weiteren CH_3 - Gruppe zu $\frac{m}{e}$ 108, die für das Vorliegen von mehreren endständigen Methylgruppen sprechen. Das Fragment $\frac{m}{e}$ 55 könnte aus einer $M - 83$ Abspaltung entstanden sein, während das Signal $\frac{m}{e}$ 83 einer $M - 55$ Eliminierung zuzuordnen ist. Die Tatsache, daß die beiden Fragmente eine Massendifferenz von 28 aufweisen, deutet darauf hin, daß sie durch $\alpha - \beta$ Spaltung an einer Carbonylverbindung entstanden ist. Das Bruchstück $\frac{m}{e}$ 55 ist typisch für Verbindungen mit olefinischem Charakter. Eine Durchsicht der Literatur (43) auf ungesättigte Carbonylverbindungen ergab, daß α, β , ungesättigte Carbonylverbindungen einen ähnlichen Abbaumechanismus aufweisen. Aufgrund dieser Hinweise und der Masse des Molekülions wurde geschlossen, daß es sich bei der vorliegenden Ver-

Die käufliche Reinsubstanz besitzt einen frischen, fruchtsäurigen, an Zitrone erinnernden Geruch.

Peak 3 und 4 entsprechen den bereits auf gepackten Säulen identifizierten Butandien, die einen süßlichen Geruch aufweisen.

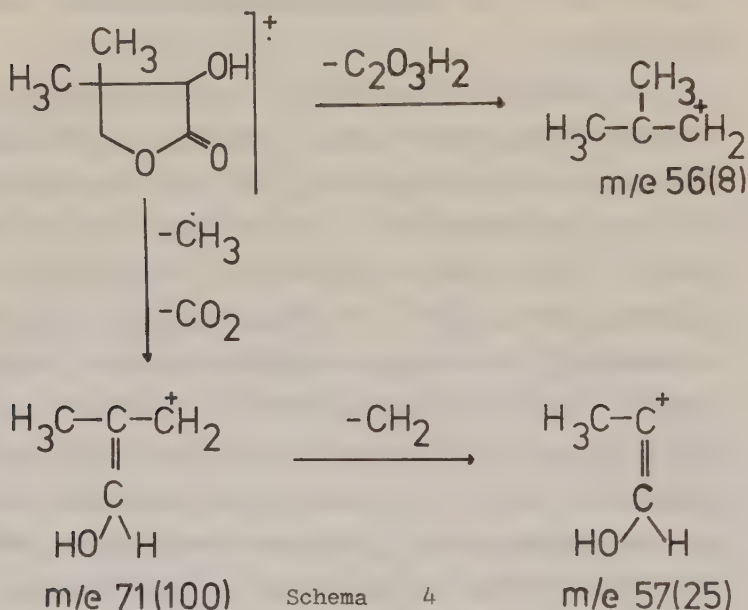
Die Masse des Molekülions von $m/e = 5$ ist mit $m/e = 138$ die gleiche wie von $m/e = 2$. Ebenso tritt ein $M - 15$ Peak auf, dessen Intensität jedoch viel geringer ist. Davon ausgehend erfolgt eine CO - Abspaltung zum Bruchstück $m/e = 95$. Die weitere Fragmentierung entspricht einer Eliminierung von 4 - Radikalen zum stabilen Tropyliumkation ($m/e = 91$). Das Bruchstück $m/e = 65$ stellt das Cyclopentadienylkation dar. Die wichtigste Fragmentation des Molekülions dürfte die $M - 56$ Abspaltung zum Basispeak $m/e = 82$ sein, die einem Verlust von Isobuten entspricht. Fragmentierungsreaktionen dieser Art, die als doppelte Spaltung von Einfachbindungen ohne Umlagerung geradzahlige Bruchstückionen aus geradzahligen Molekülionen liefert, sind als Retro - Diels - Alder - Reaktionen (RDA) bekannt, die für Cyclohexenderivate (45) (46) typisch sind. Aufgrund dieser Fragmentierungen und der Masse des Molekülions liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei Peak $m/e = 5$ um Isophoron handelt. Vergleiche des vorliegenden Massenspektrogramms mit Spektren und den gaschromatographischen Retentionszeiten der käuflichen Reinsubstanz erhärten den Befund. Isophoron riecht erfrischend nach Menthol.

Bei 6 und 7 handelt es sich um das stechend riechende B u t y r o l a c t o n und um 2 - P h e n y l ä t h a n o l, das einen blumigen honigartigen Geruch aufweist. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit den entsprechenden Daten der Reinsubstanzen.

Die gaschromatographische Analyse mittels stickstoffselektivem Detektor ergab ebenso wie die ungeradzahlige Masse des Moleküls $\frac{m}{e}$ 109 Hinweise, daß Substanz 8 stickstoffhaltig ist. Auffallend ist ein starker $M - 15$ Peak, und von der Masse 94 eine weitere Abspaltung - 28 auf $\frac{m}{e}$ 66. Das Bruchstück $\frac{m}{e}$ 66 ist in Verbindung mit $\frac{m}{e}$ 39 ein typisches Pyrrolfragment. Es könnte sich bei der vorliegenden Verbindung entweder um ein Methyl - formyl - pyrrol oder um ein Acetyl - pyrrol handeln. Beiden ist die Bildung eines resonanzstabilisierten Acylium - ions ($\frac{m}{e}$ 94) gemeinsam. Während jedoch Formylpyrrole einen deutlichen $M^+ - 1$ Peak zeigen, ist bei Acetylpyrrolen die Primärfragmentierung $M^+ - 15$ typisch. (43). Durch Vergleich der Massenintensität des MS Spektrums von 8 mit Spektren der käuflichen Reinsubstanz konnte die Verbindung als 2 - A c e t y l - p y r r o l festgelegt werden.

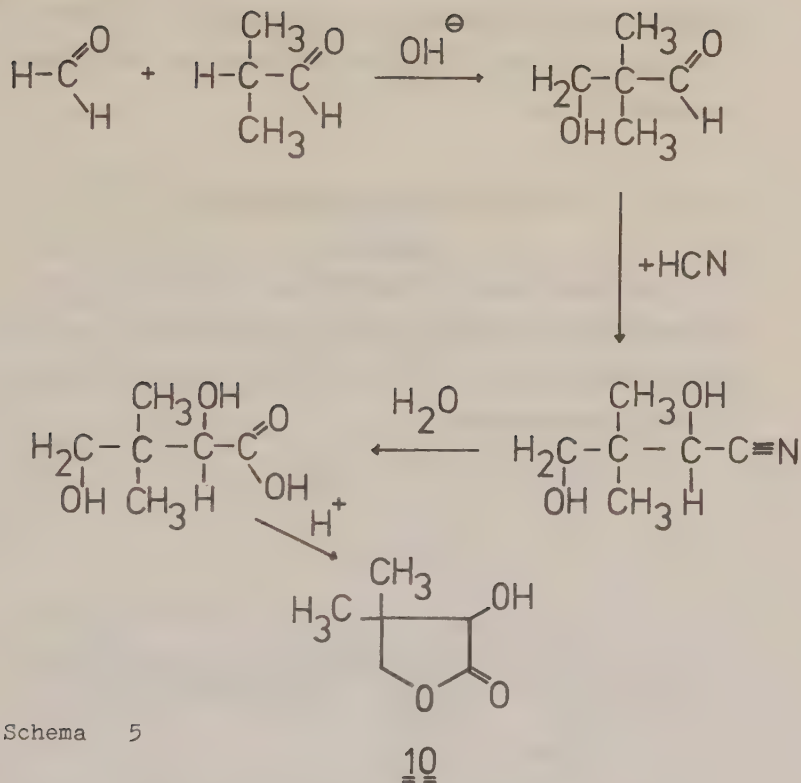
Basispeak des Massenspektrums von 10 ist $\frac{m}{e}$ 71 ; das Signal des Moleküls fehlt offensichtlich. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich mit Massenspek-

tren aus der Spektrensammlung des N B S (48). Es handelt sich bei dieser Verbindung um 3,3 Dimethyl - 2 - hydroxybutyrolacton. Die massenspektrometrische Fragmentierung erfolgt vermutlich in der unten dargestellten Form.



Da das verwendete Massenspektrometriegerät ein Quadrupolgerät war, das im Gegensatz zu Magnetfeldinstrumenten keine Übergangssignale zeigt, können die einzelnen Fragmentierungsabläufe nicht genau festgelegt werden.

Um die oben angegebene Struktur der Verbindung erhärten zu können, wurde diese Substanz nach den in (49) und (50) genannten Arbeitsvorschriften synthetisiert. Der Reaktionsweg ist folgender:



Schema 5

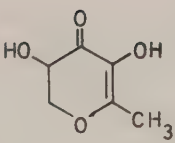
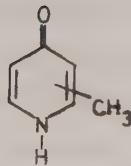
Das aus Formaldehyd und i - Butyraldehyd durch Aldolkondensation entstandene Dimethylhydroxybutyr - aldehyd reagiert mit Blausäure unter Bildung des ent - sprechenden Cyanhydrins. Die nach der Verseifung ent - stehende γ - Hydroxysäure cyclisiert bei schwachem Er - hitzen in Gegenwart von Säuren leicht zum Lacton.

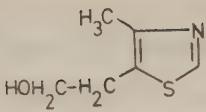
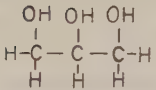
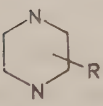
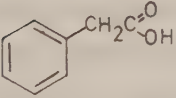
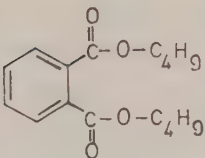
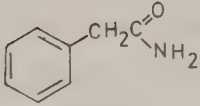
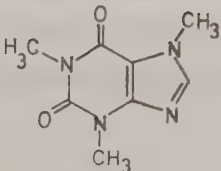
Von den im mittelflüchtigen Anteil identifizierten Substanzen sind Phoron, Isophoron und 3,3 - Dimethyl - 2 - hydroxybutyrolacton zum ersten Mal im Kakao nach - gewiesen worden.

4.2. Analyse der schwerflüchtigen Fraktion

Das Kapillargaschromatogramm (Abbildung 6) der schwerflüchtigen kakaotypischen Aromafraktion weist 11 Hauptkomponenten auf. Tabelle (2) zeigt die identifizierten Verbindungen.

T a b e l l e 2
=====

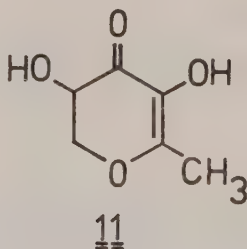
	A	B	C	D
11	 <chem>CC1=C(O)C(=O)C(O)CO1</chem>	144(100), 115(6), 101(85) 73(51), 72(76), 55(92) 43(95)	52	-
12		103(18), 86(5), 74(19) 61(18), 45(35), 44(18) 43(100)		
13	 <chem>CC1=CC(=O)C=CN1</chem>	109(83), 108(8), 82(10) 81(19), 80(100), 67(5) 66(5), 54(11), 53(19) 52(11), 51(7)	-	

		A	B	C	D
14		145(2), 144(2), 143(34) 125(2), 114(9), 113(40) 112(100), 86(6), 85(30) 71(14), 59(17), 45(41)	25	+	i.H.
15		61(100), 44(50), 43(58) 31(2)	43	-	i.H.
16		86(95), 85(100), 58(41) 57(42), 55(15)	43		
17		136(61), 92(28), 91(100) 45(51)	47	+	i.H.
18		223(7), 205(6), 150(17) 149(100)	42	V	i.H.
19		135(20), 92(85), 91(100) 65(25), 63(15), 51(12)		-	i.H.
20		154(75), 153(7), 125(31) 110(5), 98(6), 72(40) 70(100), 56(12), 55(20)			
21		194(100), 193(11), 165(7) 110(10), 119(89), 89(45) 81(14), 67(88), 66(14) 56(18), 55(71)	47	+	i.H.

Zur Erläuterung der Tabelle:

Spalte	A:	Massenspektrum der Verbindung
Spalte	B:	M S - Literatur
Spalte	C:	(+) = im Kakaoaroma nachgewiesen (-) = bis jetzt noch nicht nachgewiesen V = Verunreinigung
Spalte	D:	Vergleichssubstanzen: i.H. = im Handel erhältlich

Eine Hauptkomponente dieser Fraktion ist das bereits auf gepackten Säulen identifizierte und auch in der mitteflüchtigen Fraktion zu einem geringen Anteil nachweisbare 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on. (11).



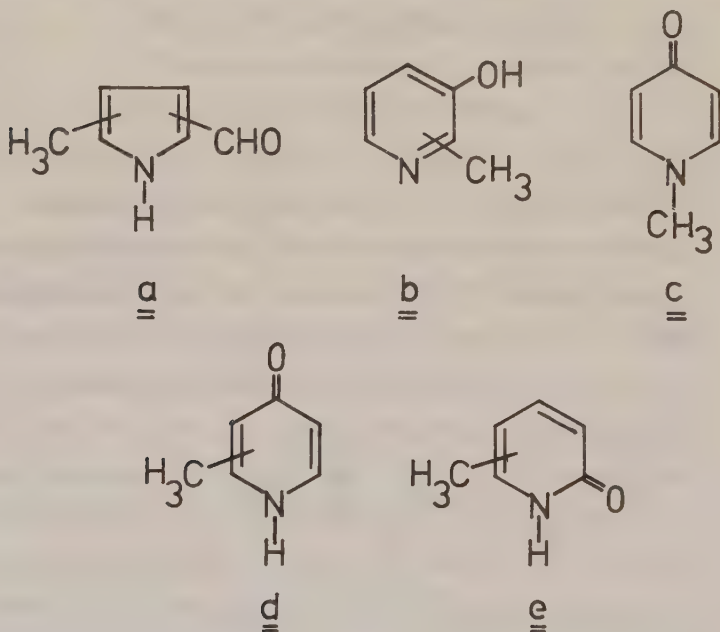
Diese karamellig riechende Verbindung isolierte W. Seilmeier (51) nach der Umsetzung von Glucose mit Alkylammoniumacetaten in wäßriger Lösung, wobei die Struktur erst später von Hodge und Mitarbeiter ermittelt wurde. (52). Inzwischen wurde diese Substanz in

verschiedenen erhitzten Lebensmitteln, wie gekochten Gemüsen und erhitztem Fleisch, (53), aber auch in Bitterschokolade nachgewiesen. (54). Mit der Identifizierung im Aromaöl gelang jedoch der Nachweis, daß diese Substanz bereits Bestandteil des Kakaoaromas ist und nicht erst durch aromaveredelnde Schritte, wie z. B. das Conchieren, entsteht.

Die Struktur von 12 läßt sich allein mit den Informationen, welche die massenspektrometrische Fragmentierung liefert, nicht festlegen. Aus der Tatsache, daß das Massenspektrogramm als höchste Masse das ungeradzahlige Signal $\frac{m}{e}$ 103 aufweist, die gaschromatographische Analyse mit dem stickstoffselektiven Detektor aber keinen Stickstoff anzeigt, kann geschlossen werden, daß das Moleküllion der Verbindung instabil ist, und somit fehlt. Die Massen $\frac{m}{e}$ 45, $\frac{m}{e}$ 61 und $\frac{m}{e}$ 74 sind typische Sauerstoffindikationen. Bedingt durch das Fehlen von Signalen bei $\frac{m}{e}$ 30 und $\frac{m}{e}$ 31 können Ätherverbindungen, Methylester und primäre Alkohole ausgeschlossen werden. Aromatenbruchstücke und größere Sequenzen von Alkyl- und Alkanoylionen sind nicht vorhanden. Entsprechend der Fragmentierung läßt sich über die Substanz nur aussagen, daß es sich um eine aliphatische Verbindung mit mehreren sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen handelt.

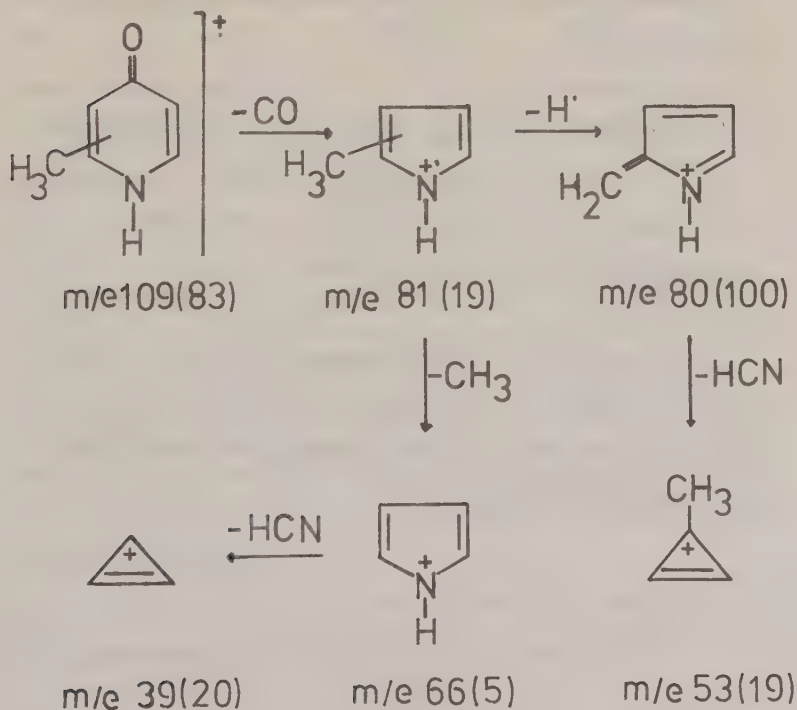
Die Primärfragmentierung von Substanz 13 ist die Abspaltung einer COH - Gruppe auf den Basispeak $\frac{m}{e}$ 80,

der für ein Methylpyrrol typisch ist. Die weiteren Abbau-
produkte sind typische Pyrrolfragmente. Aufgrund der mas-
senspektrometrischen Fragmentierung stehen folgende Struk-
turen zur Diskussion, da Methylpyrrole, Hydroxy - methylpy-
ridine und Pyridone das stabile Methyl - pyrronion bilden.



Das Formyl - methyl - pyrrol (a) scheidet von vorne-
herein aus, da die ringständige Aldehydgruppe einen inten-
siven $M^{(+)} - 1$ Peak zeigen müßte. Es dürfte sich auch nicht
um 3 - Hydroxy - methyl - pyridin (b) handeln, da laut
(55) bei Verbindungen dieser Art das Molekülion Basispeak
ist. Das in der Literatur (56) beschriebene Spektrum von
N - methyl - 4 - pyridon (c) stimmt jedoch nicht mit dem

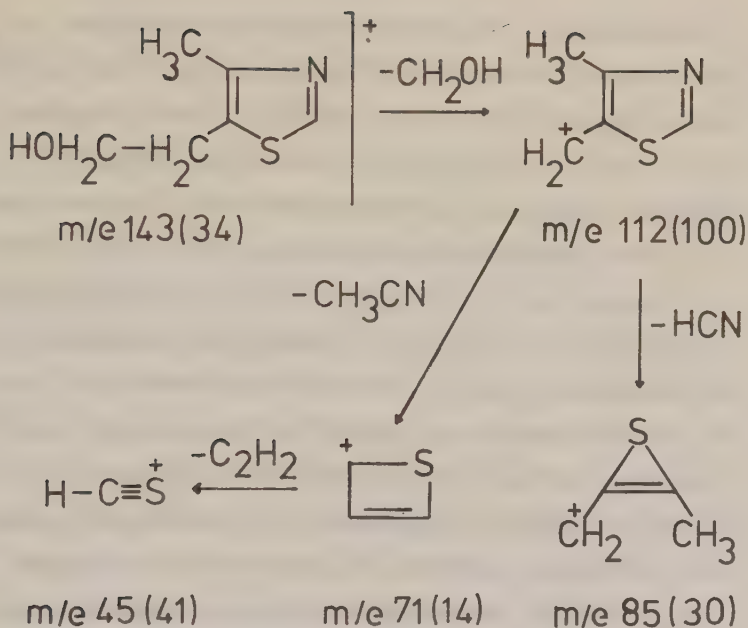
vorliegenden überein. Die Unterscheidung von C - methyl - lierten 2 - und - 4 - Pyridonen ist aufgrund der sehr ähnlichen massenspektrometrischen Fragmentierung sehr schwierig. Jedoch deutet das schwache, einem Methylfuranion entsprechende Signal $\frac{m}{e}$ 82 auf ein 4 - Pyridon hin. C - Methyl - 2 - pyridone eliminieren wegen des induktiven Effekts des Stickstoffatoms leichter CO, was zur Bildung des Methyl - Pyrrolions $\frac{m}{e}$ 81 führt. Dieser Befund wird durch das Literaturspektrum (57) von 6 - Methyl - 2 pyridon gestützt, das die Masse $\frac{m}{e}$ 82 kaum zeigt. Es handelt sich also um ein C - Methyl - 4 - Pyridon .



Schema (6) zeigt den Abbaumechanismus.

Die Lage der Methylgruppe läßt sich aufgrund der massenspektrometrischen Fragmentierung nicht genau festlegen.

Die Hauptabspaltung $M^{(+)} - 31$ bei Substanz 14 ist charakteristisch für primäre Alkohole. Der $M + 2$ - Peak in einer relativen Intensität von 5 % zum Molekül - peak deutet auf die Anwesenheit des Schwefelisotops S^{34} hin. Da als weiteres Heteroatom mittels stickstoffselektivem Detektor Stickstoff nachgewiesen wurde, ist zu vermuten, daß es sich bei vorliegender Verbindung um ein Thiazol handelt. Die größte Intensität zeigt Substanz 14 bei $\frac{m}{e}$ 112. Die von dieser Masse ausgehende Eliminierung von Blausäure ist typisch für in 2 - Position unsubstituierte Thiazole. Dagegen ist das Signal $\frac{m}{e}$ 71 ein spezifisches Abbauprodukt von 4 - Methylthiazolen. Die Struktur der als 4 - M e t h y l - 5 - (h y d r o x y ä t h y l) - t h i a z o l vorgeschlagenen Verbindung konnte durch Vergleich mit dem Massenspektrum der käuflichen Substanz und der gaschromatographischen Retentionszeiten identifiziert werden.



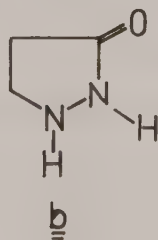
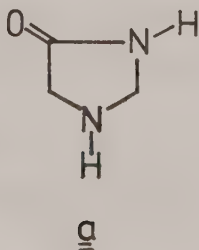
Schema 7

Dieses praktisch geruchlose Thiazolderivat wurde bereits von (35) im Kakaoaroma nachgewiesen und kommt nach dem Bericht dieser Autoren zusammen mit seinem Dehydratisierungsprodukt (4 - Methyl - 5 - vinylthiazol) vor, das ein stark nussiges Aroma besitzt. Diese Verbindung konnte jedoch von uns im vorliegenden Aromastoffgemisch nicht nachgewiesen werden.

Die im Gaschromatogramm als Hauptbestandteil vertretene Substanz 15 zeigte bei der massenspektrometrischen

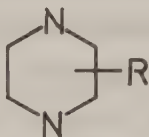
Fragmentierung offenbar kein Molekülion. Aufgrund des Basispeaks $\frac{m}{e}$ 61 und einem Signal bei $\frac{m}{e}$ 31 konnte rückgeschlossen werden, daß es sich bei dieser Verbindung um G l y c e r i n handelt. Glycerin kann als Zwischenprodukt der alkoholischen Gärung während der Fermentation und beim Fettstoffwechsel auftreten. (58). Es wird bei der Extraktion der Aromasubstanzen aus dem Röstgut mit erfaßt und dient bei der Isolierung der Aromastoffe durch Hochvakuumdestillation offenbar als Aromaträger.

Setzt man voraus, daß bei der in geringen Mengen auftretenden Substanz 16 das geradzahlige Signal $\frac{m}{e}$ 86 die Masse des Molekülions darstellt, so muß die Verbindung zwei N - Atome aufweisen. Auffallend ist der starke Peak bei $\frac{m}{e}$ 85, der darauf hindeutet, daß durch Wasserstoffabspaltung von $\frac{m}{e}$ 86 ein besonders resonanzstabilisiertes Ion entsteht. Als Verbindungen, die sowohl von ihrer Molekularzusammensetzung als auch von ihrer Schwerflüchtigkeit her in Betracht kämen, können nur 2 - Imidazolidinon (a) und Pyrazolidinon (b) genannt werden.



Die massenspektrometrischen Daten von 2 - Imidazolidinon liegen aus der Literatur (59) vor und sind mit den aufgefundenen nicht identisch. Es kann sich ebenfalls nicht um Pyrazolidinon handeln, da einerseits dessen Entstehung in Naturprodukten schwer vorstellbar ist und andererseits eine andere massenspektrometrische Fragmentierung zu erwarten wäre.

Es liegt demzufolge die Annahme nahe, daß bei dem vorliegenden Massenspektrum das Molekülion $M^{(+)}$ fehlt. Damit ist eine genaue Identifizierung der Substanz leider unmöglich. Da Piperazin eine ähnliche massenspektrometrische Fragmentierung aufweist, könnte es sich bei der vorliegenden Verbindung um ein Piperazin mit einem nicht näher definierbaren Rest R handeln.



Bei Substanz 17 handelt es sich um Phenylessig - säure, die bereits auf gepackten Säulen identifiziert wurde und einen stark süßen, karamelligen Geruch auf - weist, der das Gesamtaroma mit beeinflusst. Diese Ver - bindung wurde bereits im Rohkakao nachgewiesen (15) und kann somit nicht dem typischen Röstaroma zuge - ordnet werden.

Die Massenzahlen von 19 sind typisch für Di - n - butyl - phthalat. Phthalsäureester sind häufig als Weichmacher in Kunststoffen enthalten und treten des - halb oft als Verunreinigung auf (44).

Die Verbindung 19 hat eine ähnliche Fragmentierung wie die Phenylelessigsäure. Die Masse des Moleküls ($\frac{m}{e}$ 135) deutet jedoch ebenso wie die gaschromatographische Analyse auf eine Stickstoffverbindung hin. Gemäß massenspektrometrischer Fragmentierung dürfte es sich bei 19 um Phenylacetamid handeln. Der Beweis erfolgte gaschromatographisch und massenspektrometrisch durch Vergleich mit den Daten der käuflichen Reinsubstanz.

Die Struktur der laut gaschromatographischer Analyse stickstoffhaltigen Substanz 20 konnte bisher noch nicht bestimmt werden. Das nach der Masse des Moleküls ($\frac{m}{e}$ 154) zweitstärkste Signal $\frac{m}{e}$ 70 ist ein typisches Bruchstück für cyclische aliphatische Amine. Die Primärfragmentierung M - 29, die der Abspaltung einer COH - Gruppe entsprechen kann, deutet auf die Anwesenheit von einer oder mehreren Carbonylfunktionen hin.

Die Annahme, daß es sich um ein cyclisches Dipeptid (Diketopiperazin) aus Glycin und Prolin handeln könnte, ließ sich nicht bestätigen, da nach der Synthese dieser Substanz die Massenspektren keine Übereinstimmung zeigten.

Die massenspektrometrische Fragmentierung allein läßt über die vorliegende Substanz nur die Aussagen zu, daß es sich um eine gesättigte cyclische Verbindung mit Carbonyl - und Aminfunktionen handeln muß.

Von den in der schwerflüchtigen Fraktion in ihrer Struktur festgelegten Verbindungen sind das oben erwähnte Pyron 11, das Pyridon 13, das Glycerin 16 und Phenylacetamid 19 bis jetzt im Kakaoaroma noch nicht nachgewiesen.

4.3. Analyse der kakaotypischen Fraktion aus der Horizontaldestillationsanlage

Von den verschiedenen Fraktionen, die mit Hilfe der beschriebenen Horizontaldestillationsanlage aufgetrennt und isoliert werden konnten, wurde nur die Fraktion A (siehe Abbildung 3) massenspektrometrisch untersucht, da diese als einzige den kakaotypischen Gesamteindruck aufwies. In dieser Fraktion müssen demnach noch sämtliche Substanzen vorhanden sein, die zum kakaotypischen Geruchseindruck beitragen. Die für die Untersuchung zur Verfügung stehenden Substanzmengen waren sehr gering und lagen bei 10^{-6} g/ml Lösungsmittel. Eine Anreicherung der Aromastoffe durch teilweises Entfernen des Lösungsmittels mittels Stickstoff war nicht möglich, da diese sensorisch aktiven Verbindungen etwa im gleichen Verhältnis wie das Lösungsmittel ausgetragen wurden.

Die Identifizierung der in den übrigen Fraktionen enthaltenen Verbindungen erfolgte gaschromatographisch durch Vergleich der Retentionszeiten mit den bereits in der schwerflüchtigen Fraktion isolierten Verbindungen.

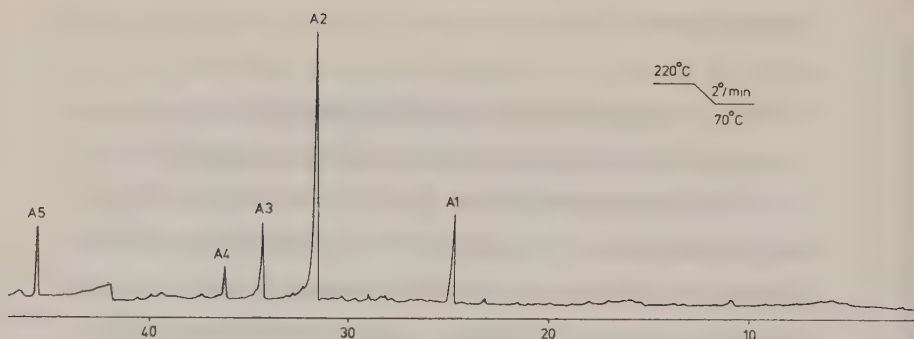
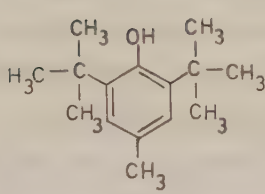
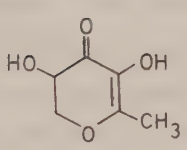
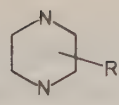
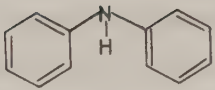


Abbildung 9: Gaschromatogramm der Fraktion A

Auftrennung auf einer Dünnschicht-
glaskapillarsäule vom Typ WG 11

T a b e l l e 3
=====

	A	B	C	D
A ₁		220(14), 205(53), 177(10) 145(19), 133(16), 131(18) 128(19), 119(20), 115(238) 105(35), 95(25), 91(41) 81(46), 77(32), 67(41) 57(100), 55(44), 41(59)	47	V i.H.
A ₂		144(100), 115(6), 101(85) 73(51), 72(76), 55(92) 43(95)	52	-
A ₃		86(95), 85(100), 58(41) 57(42), 55(15)		
A ₄		86(75), 85(99), 58(100) 57(50), 55(28)	43	
A ₅		170(23), 169(100), 168(75) 167(45), 77(24), 66(18) 51(24)	47	- i.H.

Zur Erläuterung der Tabelle:

Spalte	A:	Massenspektrum der Verbindung
Spalte	B:	M S - Literatur
Spalte	C:	(+) = im Kakaoaroma nachgewiesen (-) = bis jetzt noch nicht nachgewiesen V = Verunreinigung
Spalte	D:	Vergleichssubstanzen: i.H. = im Handel erhältlich

Hauptpeak im Gaschromatogramm (Abbildung 9) der Fraktion A war das in der schwerflüchtigen Fraktion mit Nr. 11 bezeichnete 2,3 - Dihydro - 3,5 - dihydroxy - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 on. (A_2). Obwohl diese Verbindung nur einen schwach süßlich - karamelligen Geruch aufweist, scheint sie doch für das Kakaoaroma von Bedeutung zu sein. Es wird vermutet, daß sie eine ähnliche Wirkung wie das strukturverwandte Maltol aufweist, das für Kakao eine aromaverstärkende Wirkung besitzt. (60).

Von dem im schwerflüchtigen Anteil aufgefundenen Substanzen war lediglich noch die in ihrer Struktur nicht restlos aufklärbare Substanz (16) zu erkennen, die hier als A_4 bezeichnet wird.

Die massenspektrometrische Fragmentierung einer weiteren Verbindung A_3 ist der von A_4 sehr ähnlich. Der einzige Unterschied besteht in der stärkeren Intensität von $\frac{m}{e}$ 58, sodaß die Vermutung naheliegt, daß (A_3) und (A_4) Stellungsisomere sind. Diese Verbindung war im schwerflüchtigen Aromaöl nicht nachzuweisen, da sie eine vergleichbare Retentionszeit wie Glycerin aufweist und somit nicht abzutrennen war.

Der Peak (A_1) ließ sich massenspektrometrisch und gaschromatographisch als 2,6 - Ditertiärbutyl - 4 - methyl - phenol (Ionol) nachweisen, das als Stabilisator im Äther verwendet wird und deshalb hier als Verunreinigung vorkommt.

Die in sehr geringen Mengen auftretende Substanz A_6 zeigt mit dem Basispeak $\frac{m}{e}$ 169, dem davon ausgehenden Wasserstoffabspaltungsprodukt $\frac{m}{e}$ 168 und dem Phenylion $\frac{m}{e}$ 77 die typische Fragmentierung von stickstoffhaltigen Diphenylverbindungen. Die Annahme, daß es sich um Diphenylamin handeln könnte, wurde gaschromatisch durch Vergleich der Retentionszeiten der Reinsubstanz erhärtet. Diese schwach blumig riechende Substanz wurde im schwerflüchtigen Aromaöl nicht gefunden. Es konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei dieser Verbindung um einen Aromastoff oder um eine Verunreinigung handelt.

Mit Hilfe der Horizontaldestillation wurden folglich zwei Verbindungen isoliert, nämlich 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on und Substanz (16), die beide auch im schwerflüchtigen kakaotypischen Aroma nachweisbar waren. Da die Fraktion A ebenfalls kakaotypisches Aroma besitzt, liegt der Schluß nahe, daß die beiden Substanzen allein oder in Verbindung miteinander für das Kakaoaroma von großer Bedeutung sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Spuren anderer Substanzen, die gaschromatographisch nicht mehr erfaßbar sind, am Zustandekommen der kakaotypischen Aromanote beteiligt sind.

5. Gaschromatographische Untersuchung

von Aromafraktionen aus unconchierten

und conchierten Schokoladenmassen

Nachdem die Identität der meisten aus gerösteten Aromavorstufen isolierten Aromastoffe feststand, stellte sich die Frage, inwieweit diese mit den Komponenten von schwerflüchtigen Aromafraktionen aus Schokoladenmassen vergleichbar waren. Die kapillargaschromatographische Untersuchung erstreckte sich auf schwerflüchtige Aromaöle sowohl aus unconchierten als auch aus conchierten Schokoladenmassen. Proben dieser Art wurden deshalb ausgewählt, weil beim Conchieren im Verlauf einer zeitlichen überlagerten mechanisch - thermischen Behandlung von Schokoladenmassen die entscheidende Phase der Aromaveredelung von Schokolade abläuft, und durch Vergleich der Gaschromatogramme eventuell zugleich Einblicke über Veränderungen einzelner Aromastoffe während dieses Prozesses gewonnen werden könnten.

Die Isolierung der kakaospezifischen Aromakomponenten erfolgte auf einem bereits von (9) vorgeschlagenen Weg durch Extraktion der entfetteten Schokoladenmassen mit reinem Äthanol. Nach Entfernung des Lösungsmittels und anschließender Hochvakuumdestillation wurden Aromakondensate gewonnen, die sich sensorisch mit den schwerflüchtigen Aromafraktionen aus Vorstufen als nahezu

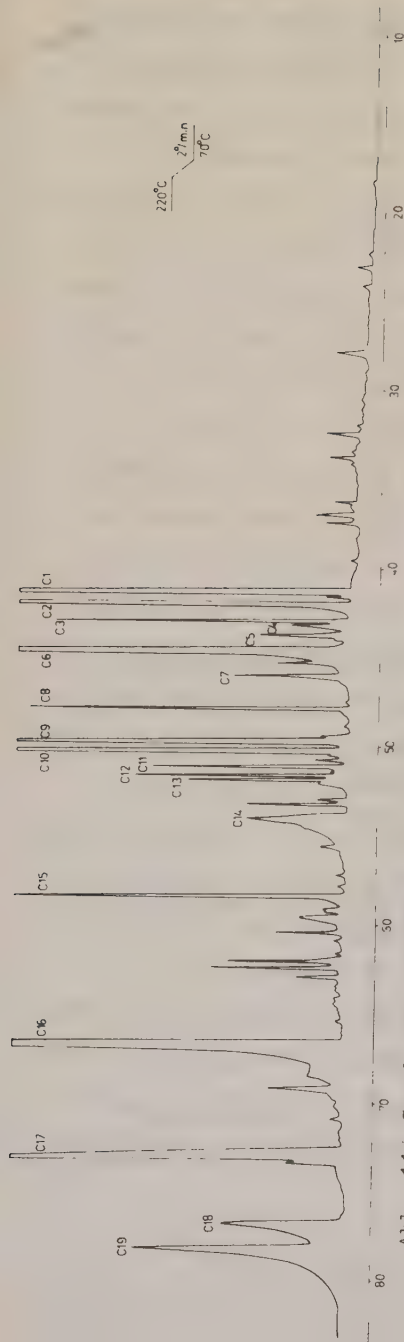


Abb. 11: Gaschromatogramm eines schwerflüchtigen Aromaöls aus conchierten Schokoladenmassen

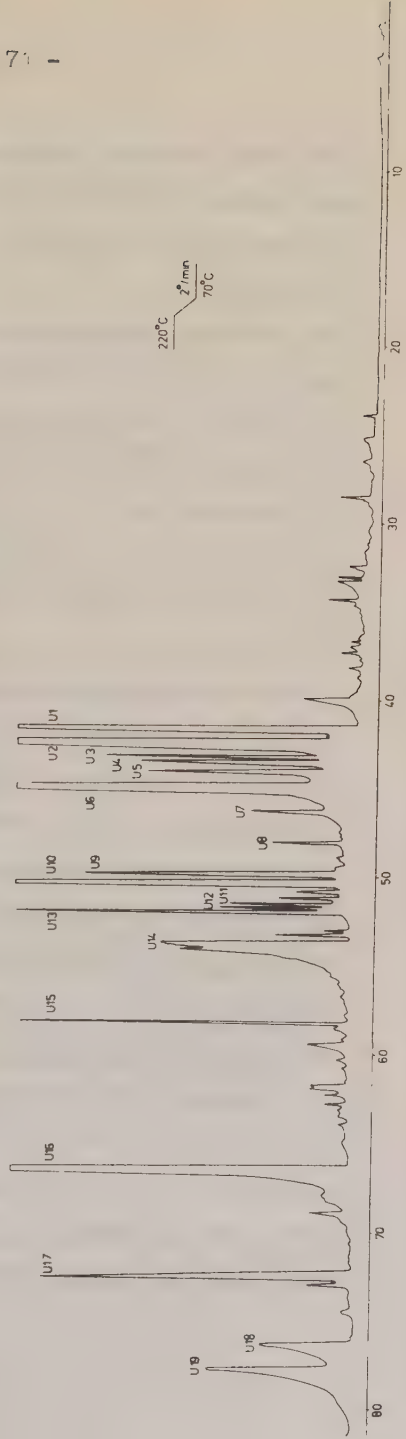


Abb. 10: Gaschromatogramm eines schwerflüchtigen Aromaöls aus unconchierten Schokoladenmassen

identisch erwiesen. Die Gaschromatogramme des Aromaöls aus Schokoladenmassen zeigten allerdings im Vergleich zu der aus Vorstufengemischen dargestellten und isolierten Aromafraktion eine Vielzahl weiterer Substanzen, die jedoch aufgrund eingehender sensorischer Befunde das kakao-typische Aroma nicht beeinflussen. Durch Vergleich der Retentionszeiten konnten die meisten der in der schwerflüchtigen Aromafraktion aus Vorstufen identifizierten Verbindungen auch in dem aus conchierten Schokoladenmassen isolierten Aromaöl nachgewiesen werden. (Tab. 4)

Die Unterschiede zwischen den Gaschromatogrammen von schwerflüchtigen Aromafraktionen unconchiierter und conchiierter Schokoladenmassen lag gemäß Abbildung (10) und (11) hauptsächlich in der Intensität der einzelnen Peaks. Die verwendete Isolierungsmethode ist jedoch nicht dazu geeignet, genaue quantitative Aussagen über einzelne Inhaltsstoffe zu geben. Deshalb wurde nach einer Aromakomponente gesucht, die quantitativ zu bestimmen ist und mit deren Hilfe sich der Ablauf der Aromaentwicklung während des Conchierens verfolgen läßt. Als geeignet erschien das bereits mehrfach erwähnte 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on, da diese Verbindung für das Kakaoaroma offensichtlich von Bedeutung ist. Die quantitative Bestimmung erfolgte nach einer von Seilmeier (51) beschriebenen Methode, wonach diese Substanz durch Behandlung mit einer wasserfreien

T a b e l l e 4
=====

A	B	C	D
C 2	11	3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on	41,9
C 5	14	4 - Methyl - 5 - (β - hydroxyäthyl) - thiazol	43,7
C 6	15	Glycerin	44,6
C 14	17	Phenyllessigsäure	54,1
C 15	18	Di - butyl - phthalat	58,4
C 17	21	Coffein	73,0

Zur Erläuterung der Tabelle:

Spalte A: Bezeichnung der Substanz im Gas-
chromatogramm einer schwerflüch-
tigen Aromafraktion aus conchier-
ten Schokoladenmassen. (Abb. 11)

Spalte B: Bezeichnung der Substanzen im
Gaschromatogramm einer schwer-
flüchtigen Aromafraktion aus
Vorstufen.

Spalte C: Verbindungen

Spalte D: Retentionszeiten (min)

Lösung von HCL in Methanol in Isomaltolmethyläther übergeführt und somit von Begleitstoffen angetrennt werden kann. Die Bestimmung erfolgte gaschromatographisch auf einer gepackten SP 1000 Trennsäule.

Die Untersuchung von conchierter und unconchierter Schokoladenmasse hat ergeben, daß die Konzentration dieser Verbindung im Verlaufe des Conchierprozesses auf etwa 70 % der Ausgangskonzentration reduziert wird. Es ist anzunehmen, daß dieser Verlust aufgrund des sehr niedrigen Dampfdruckes der Verbindung nur zu einem geringen Teil durch Verdunstung, zum größeren Teil jedoch infolge chemischer Umsetzungen entstehen dürfte.

Die Untersuchung chemischer Reaktionen während des Conchierens stecken noch in den Anfängen, doch konnte bereits gezeigt werden, daß selbst im abgeschlossenen System ohne die Möglichkeit einer Verdunstung Aromabegleitstoffe durch mechanische Scherbeanspruchung von milchfreier Schokoladenmasse bei 75° C reduziert werden. Diese Vorgänge, die nur durch chemische Umsetzungen erklärbar sind, konnten allerdings bis jetzt nur über die gaschromatographische Bestimmung der relativen Konzentration unspezifischer leichtflüchtiger Stoffe (Headspace - Technik) und die quantitative Bestimmung von Essigsäure im Spurenbereich nachgewiesen werden.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist erstmalig der Nachweis gelungen,

daß auch am kakaospezifischen Aromakomplex direkt beteiligte Verbindungen wie dieses γ - Pyranderivat unter dem Einfluß des Conchierens eine quantitative Veränderung erfahren. Dieser Befund ist für die weitere Aufklärung der Vorgänge bei der Entwicklung des Schokoladenaroms durch das auch heute noch übliche Conchieren von Bedeutung.

6.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Das spezifische Kakaoaroma entsteht beim Rösten der in fermentiertem Rohkakao enthaltenen Vorstufen. Deshalb erfolgte die Gewinnung eines von unspezifischen Begleitstoffen weitgehend befreiten kakaotypischen Aromaöls nicht direkt aus gerösteten Kakaobohnen, sondern aus den aus Rohkakao extrahierten und anschließend gerösteten Vorstufen. Zur weiteren Isolierung und Reinigung des Aromakomplexes wurde der Weg über eine Extraktion mit Äthanol und eine anschließende Hochvakuumdestillation gewählt. Auf diese Weise fiel eine mittelflüchtige und eine schwerflüchtige Aromafraktion an, wobei die kakao-spezifischen Aromastoffe hauptsächlich im schwerflüchtigen Bereich sensorisch nachweisbar waren.

Zielsetzung der weiteren Arbeiten war eine möglichst weitgehende Identifizierung der Inhaltsstoffe dieser beiden Fraktionen nach einer optimalen gaschromatographischen Auftrennung in die Einzelsubstanzen.

Die Dünnschichtchromatographie erwies sich als eine weder zur Auftrennung noch zur Vortrennung geeignete Methode, da sich die aromatischen Substanzen bereits auf der DC - Platte veränderten.

Dagegen konnte mit Hilfe der Mikrodestillation (Horizontaldestillationsanlage) eine weitere Fraktionierung des schwerflüchtigen Aromaöls erreicht werden.

Es gelang die Darstellung einer Fraktion (A), welche einerseits die typischen sensorischen Merkmale des Kakaoaromas besaß, andererseits von unspezifischen Begleit - substanzien weitgehend befreit schien.

Die Auftrennung der verschiedenen Aromafraktionen in ihre Einzelkomponenten war nur auf gaschromatographischem Weg möglich. Trennversuche auf gepackten Säulen erbrachten erste Teilerfolge. Es konnten einige der Inhaltsstoffe mit Hilfe der anschließenden massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Das Trennvermögen der gepackten Säulen war jedoch noch zu gering, um die vorhandenen Einzelkomponenten in genügend reiner Form isolieren zu können.

Die Lösung der Problems war deshalb nur von einer durch hochauflösende Kapillar - GC optimierten Auftrennung der Aromafraktion in Verbindung mit einer gleichzeitigen massenspektrometrischen Analyse der Einzelpeaks zu erwarten. Es waren demnach höchste Anforderungen an das Trenn - und Meßsystem hinsichtlich Auflösung und Nachweisgrenze zu stellen.

Deshalb wurden die einzelnen Fraktionen nach entsprechender Umrüstung eines GC - Gerätes auf einer speziellen Kapillarsäule mit Zweiphasenbelegung aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnten die Strukturen der 10 Hauptkomponenten des mittelflüchtigen Anteils aufgeklärt werden. Die 11 Haupt-

bestandteile der schwerflüchtigen Fraktion wurden gaschromatographisch in reiner Form dargestellt und davon 8 Substanzen auf Grund der erhaltenen Massenspektren identifiziert.

Zu den Strukturen der übrigen drei Verbindungen wurden Vorschläge gemacht, da die massenspektrometrische Fragmentierung als Informationsquelle allein zu einer genauen Identifizierung noch nicht aussagekräftig genug war.

Damit waren zwar die meisten Komponenten der beiden Aromafractionen identifiziert, jedoch blieb noch ungeklärt, welche dieser Substanzen den kakaotypischen Gesamteindruck ausmachen.

Um weitere Informationen in dieser Richtung zu erhalten, wurde die aus der Horizontaldestillation stammende Fraktion A massenspektrometrisch untersucht. Neben einigen Verunreinigungen konnten bereits im schwerflüchtigen Anteil isolierte Verbindungen, nämlich 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on und das Piperazinderivat (16) nachgewiesen werden. Da laut sensorischer Beurteilung Fraktion A nahezu den gleichen kakaotypischen Geruch aufweist wie das schwerflüchtige Aromaöl, wird daraus geschlossen, daß diese Verbindungen maßgeblich zum Kakaoaroma beitragen.

Aufgrund dieser Befunde wurde der Gehalt an dem oben erwähnten Pyran in Schokoladenmasse unter dem Ein-

fluß des Conchierens untersucht und eine Reduzierung dieser Substanz nach dem Conchieren um etwa 30 % festgestellt.

Die ergänzenden gaschromatographischen Untersuchungen von aus unconchierten und conchierten Schokoladenmassen isolierten Aromölen ergab, daß neben vielen Begleitsubstanzen, die offensichtlich keinen Einfluß auf das Aroma ausüben, auch hier die in der schwerflüchtigen Fraktion identifizierten Verbindungen nachweisbar waren. Damit wurde der Beweis erbracht, daß die aus den gerösteten Vorstufen extrahierten spezifischen Aromastoffe mit denen aus Kakaoerzeugnissen identisch sind. Die unterschiedlichen Geruchseindrücke werden von den verschiedenen Aromabegleitnoten hervorgerufen.

7.

Literaturverzeichnis

=====

- 1) H. G. Maier, Angewandte Chemie 82, 965, (1970)
- 2) R. Tressl, R. Renner, Deutsche Lebensmittel -
rundschaue 72, 37, (1966)
- 3) L. C. Maillard, C. R. hebde. Seances Acad. Sci.
154, 66, (1912)
- 4) W. Mohr, Fette . Seifen . Anstrichmittel
Die Ernährungsindustrie 72, 695, (1970)
- 5) W. Mohr, M. Röhrle, Fette . Seifen . Anstrich-
mittel, Die Ernährungsindustrie 72, 704, (1970)
- 6) J. S. Bainbridge, S. H. Davies, J. Chem. Soz.
101, 2209, (1912)
- 7) W. Pickenhagen, P. Friedrich, Helv. Chim.
Acta, 58, 1078, (1975)
- 8) W. Diermair, L. Acker, H. Lange, Z. Lehmann,
Unters. - Forsch., 107, 25, (1958)
- 9) W. Mohr, M. Röhrle, Th. Severin, Fette . Seifen .
Anstrichmittel, 73, 515, (1971)
- 10) T. A. Rohan, Gordian, 70, (1,2,3,) 5, 59, 158,
(1970)
- 11) K. Heyns, H. Paulsen, Wissenschaft. Veröffentl.
der dt. Gesellsch. f. Ernähr. Bd. 2, 15, (1960)
Verl. Steinkopff
- 12) E. Landschreiber, Dissertation München (1974)
- 13) O. G. Vitzthum, P. Werkhoff, P. Hubert, J. of
Food Sci., 40, 911, (1975)
- 14) S. D. Bailey, D. G. Mitchell, M. L. Bazinet,
C. Weurmann, J. of Food Sci., 27, 165, (1962)
- 15) V. C. Quesnel, J. B. Roberts, Nature, 199, 605
(1963)
- 16) V. C. Quesnel, J. Sci. Fd. Agric., 16, 596, (1965)

- 17) G. P. Ricci, J. Agr. Fd. Chem., 15, 549, (1967)
- 18) A. H. M. van Elzakker, H. A. van Zutphen, Z. Lebensm. Untersuch. - Forsch., 115, 222, (1961)
- 19) P. Dietrich, E. Lederer, M. Winter, M. Stoll, Helv. Chim. Acta, 47, 1581, (1964)
- 20) J. Flament, B. Wilhelm, M. Stoll, Helv. Chim. Acta, 50, 2233, (1967)
- 21) J. P. Marion, F. Müggler.- Chavan, R. Viani, J. Bricout, D. Reymond, R. H. Egli, Helv. Chim. Acta, 50, 1509, (1967)
- 22) W. Mohr, Fette . Seifen . Anstrichmittel. Die Ernährungsindustrie, 60, 661, (1958)
- 23) H. Schmalfluss, H. Bartmeyer, Z. Untersuch. Lebensm., 63, 283, (1932)
- 24) A. Steinmann, Z. Untersuch. Lebensm., 69, 479, (1935)
- 25) M. Stoll, P. Dietrich, E. Sundt, M. Winter, Helv. Chim. Acta, 50, 1065, (1967)
- 26) M. van Praag, J. S. Stein, M. S. Tibbets, J. Agr. Fd. Chem., 16, 1005, (1968)
- 27) B. van der Wal, G. Sipma, D. K. Kettenes, A. Th. J. Semper, Recueil des Trav.. Chim. d. Pays - Bas., 87, 238, (1938)
- 28) B. van der Wal, D. K. Kettenes, J. Stoffelsma, G. Sipma, A. Th. J. Semper, J. Agr. Fd. Chem. 19, 276, (1971)
- 29) C. Weurmann, D. de Rooy, J. Food Sci., 26, 239, (1961)
- 30) G. Wolf, Die Nahrung, 2, 948, (1958)
- 31) O. G. Vitzthum, P. Werkhoff, 174th Americ. Chem. Soz. Meet. Chicago, Illinois, 28.8. - 2.9.77
- 32) H. I. Takken, L. M. van der Linde, M. Boelens, J. M. van Dort, J. Agric. Food Chem. 23, 638, (1975)
- 33) G. A. Reineccius, P. G. Keeney, W. Weissberger, J. Agr. Food Chem., 20, 202, (1972)

- 34) A. Lopez, V. C. Quesnel, Vortrag auf dem 1. Internationalen Kongreß über Kakao - und Schokolade - forschung, München, 8. - 10. Mai 1974
- 35) M. Stoll, P. Dietrich, E. Sundt, M. Winter, *Helv. Chim. Acta*, 50, 1065, (1967)
- 36) A. Lopez, V. C. Quesnel, *Rev. Int. Choc.*, 16, 19, (1971)
- 37) H. Finke, *Handbuch der Kakaoerzeugnisse*, Springer-Verlag, Berlin . Heidelberg . New York. (1965)
- 38) W. G. Fischer, Mitteilung aus dem Entwicklungs - labor
- 39) K. Grob, G. Grob, *Chromatographia*, 5, 1, (1972)
- 40) R. Kaiser, *Chromatographie in der Gasphase, II Kapillarchromatographie*, B. J. Hochschul - taschenbücher, Mannheim, Wien, Zürich, (1974)
- 41) K. Grob, H. J. Jaeggi, *Chromatographia*, 5, 11, (1972)
- 42) Firmenschrift: Carlo Erba, Milano, Nitrogen Phosphorus Selective Detektor, (1974)
- 43) H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, *Mass Spectrometrie of Organic Compounds*, Holden-Day, Inc. Cambridge, London, Amsterdam (1967)
- 44) *Römpps Chemie - Lexikon*, Franksche Verlags - buchhandlung, Stuttgart (1976)
- 45) J. Seibl, *Massenspektrometrie*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M. (1974)
- 46) J. H. Bowie, *Australien, J. Chem.*, 19, (9), 619, (1966)
- 47) A. Cornu, R. Massot, *Compilation of Mass Spektral Data*, Heyden and Sons, London, (1966)
- 48) *Spektrensammlung des National Büros of Standards (NBS)*, Washington
- 49) *Organikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1970)
- 50) E. Carter, C. F. Ney, *J. of American chem. Society*, 63, 312, (1941)

- 51) W. Seilmeier, Dissertation, München, (1968)
- 52) F. D. Mills, D. Weisleder, J. E. Hodge, Tetrahedron Letters, 15, 1243, (1970)
- 53) F. Ledl, W. Schnell, Th. Severin, Z. Lebensm. Unters. - Forsch., 160, 367, (1976)
- 54) W. Schnell, Dissertation München, (1976)
- 55) A. D. Filyugina, K. M. Dyumaev, A. A. Dubrovin, I. A. Rotermeil, Zhurnal Organicheskoi Khimii, 6, Nr. 10, 2131, (1970)
- 56) J. Bonham, E. Mc. Leister, P. Benk, J. Org. Chem., 31, 639, (1967)
- 57) W. A. Ayer, T. E. Habgood, V. Deulofen, H. R. Juliani, Tetrahedron 21 / 2169, (1965)
- 58) P. Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, G. Thieme Verlag, Stuttgart, (1972)
- 59) M. A. Baldwin, A. M. Kirkien - Konasiewitz, A. G. Loudon, A. Maccoll, D. Smith, J. Chem. Soz., (B 1). 34, (1968)
- 60) H. Wieland, Food Processing review, 27 Park Ridge, New Jersey (1972)
- 61) R. Rapp, W. Mohr, R. Heiss: Die Ernährungsindustrie, 7 - 9, (1977)
- 62) W. Mohr, R. Heiss, in Vorbereitung

B E x p e r i m e n t e l l e r T e i l

1. Isolierung der Vorstufen

1.1. Extraktion

Jeweils 500 g Rohkakaokernbruch der Provenienz Ghana werden in einem Starmix einer 3 - maligen Rühr-extraktion mit je 500 ml Petroläther (40° - 60° C) unterworfen. Der entfettete Rückstand wird auf gleiche Weise mit einem Gemisch aus Methanol (3 Teile) und Wasser (1 Teil) 1 x mit 1000 ccm und 2 x mit je 500 ccm extrahiert.

1.2. Reinigung

Vor der säulenchromatographischen Reinigung des Vorstufenextraktes wird der Methanolanteil mit Hilfe eines Kaskadenverdampfers bei einer Temperatur der Verdampferfläche von 40° C und einem Druck von etwa 1 Torr auf einen Gehalt von kleiner als 3 % abgesenkt. Die Durchlaufgeschwindigkeit während der Destillation beträgt 30 ml Extrakt /min.

In den verbleibenden tiefbraunen, wäßrigen Destillationsrückstand werden zur Vorreinigung etwa 20 Vol. % mit Methanol und Aceton gereinigtes, im Wasser vorgequollenes Polyamidpulver (MN - Sc 6, Korngröße 0,16 mm) eingerührt und das Gemisch einige Minuten stehen gelassen. Nach der Filtration gibt man den Extrakt zur Nachreinigung auf eine mit Polyamid gefüllte Säule

(Höhe 35 cm, Durchmesser 5 cm), wobei die restlichen Polyhydroxyphenole adsorbiert werden. Die Reinigung des Adsorbtionsmittels erfolgt in der oben genannten Art.

Das nach dem Nachwaschen mit etwa 500 ml H_2O erhaltene Eluat wird bei $-20^{\circ}C$ durchgefroren und anschließend in einer Gefriertrockenanlage ohne Beheizung der Verdampferflächen getrocknet. Das flockige Trockensprodukt, das in einer Ausbeute von ca. 5 % (bezogen auf Rohkakaokernbruch) anfällt, wird sofort in einen Exsikkator überführt und ist über P_2O_5 längere Zeit unverändert haltbar.

1.3. Bestimmung des Bräunungsgrades von Vorstufen - gemischen

100 mg des gefriergetrockneten Vorstufengemisches werden in Wasser gelöst und auf 20 ml aufgefüllt. Die Extinktion der Lösung wird gegen Wasser bei 420 nm gemessen. Bei der Extinktion 0,3 gilt das Vorstufengemisch als vorgeschädigt und ist deshalb nicht mehr verwendbar.

2. Röstung von Aromavorstufen

2.1. im Gaschromatographen

Bis zu 2 g des Röstgutes werden in einem 5 x 10 cm großen "Sandwich" aus Aluminiumfolie nach der Methode

von W. Mohr (4) im Heizraum eines Gaschromatographen geröstet. Rösttemperatur 121°C , Röstzeit 10 min.

2.2. im Trockenschrank

Bei größeren Ansätzen (bis zu 50 g) wurde das Vorstufengemisch bei den obengenannten Röstbedingungen in einem Trockenschrank erhitzt. Der Temperaturverlauf wird durch vier Thermoelemente sowohl im Ofenraum als auch im Röstgut mittels eines Kompensationsschreibers registriert.

3. Isolierung der Aromastoffe

3.1. Extraktion

Je 5 g der gerösteten Vorstufen werden in einem Zentrifugenglas unter der Verwendung eines Ultra - Turrax - Rührstabes mit 3 x je 100 ml Äthanol p. a. extrahiert. Die nach dem Abzentrifugieren vereinigten Extrakte von insgesamt 20 g Röstprodukt engt man auf etwa 100 ml ein und läßt die Lösung bei -20°C über Nacht stehen. Nach der Filtration der ausgefallenen Purine wird in einem 25 ml Spitzkölbchen das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, sodaß der Rückstand in dünner Schicht auf der gesamten Innenfläche Kölbchens verteilt ist.

3.2. Hochvakuumdestillation

Zur Isolierung der schwerflüchtigen Bestandteile werden mit Hilfe der auf Seite 22 dargestellten Hochvakuumdestillationsanlage zunächst Lösungsmittel - reste und leichtflüchtige Substanzen bei einem Druck von 1×10^{-1} Torr und einer Badtemperatur von 20°C aus dem Extraktionsrückstand abgetrennt und in der stickstoffgekühlten Falle 2 aufgefangen. Nach 15 Minuten erhöht man die Badtemperatur auf 30°C , kühlt Falle 1 nun ebenfalls mit flüssigem Stickstoff und kondensiert darin nach einer Destillationsdauer von 30 Minuten die Bestandteile mittlerer Flüchtigkeit. Durch Absenken des Druckes auf 1×10^{-3} Torr und Erhöhung der Badtemperatur auf $+ 60^{\circ} \text{C}$ werden die schwerflüchtigen aromaspezifischen Bestandteile aus dem Rückstand freigesetzt, die im ersten Drittel der Destillationsbrücke kondensieren. Nach weiteren 40 Minuten wird die Destillation abgebrochen, die Anlage mit Stickstoff begast und das Aromaöl unter ständigem Stickstoffstrom in Methanol aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgt in einem kleinen Schliffgefäß unter Schutzgas bei $- 20^{\circ} \text{C}$.

4. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Die dünnschichtchromatographische Trennung erfolgte nach folgenden Methoden:

1) Sorptionsmittel: Kieselgel F (Merck), Schicht-
dicke 0,25 mm

Laufmittel: Äthanol : Aceton (9 : 1)

Unter UV - Licht konnten zwei fluorescenz -
löschende Substanzflecken erkannt werden.

2) Sorptionsmittel: Cellulose (Merck), Schicht -
dicke 0,1 mm

Laufmittel: Dichlormethan : Acetonitril (1 : 1)

Sprühmittel 1): 2,7 - Dichlorfluorescein (0,2 %
in Äthanol

Sprühmittel 2): Jod (Joddämpfe in der geschlos-
senen Chromatographierwanne)

5. Vorfraktionierung mittels einer Horizontaldestillationsanlage

Die Vortrennung eines schwerflüchtigen Aromaöls erfolgte im wesentlichen nach der auf Seite 25 beschriebenen Arbeitsweise. Um die Reproduzierbarkeit der Trennung gewährleisten zu können, müssen die Destillationsbedingungen genau eingehalten werden. Nachdem im Gradientenofen das Temperaturgefälle von 150° C zu 100° C erreicht ist, wird die Kühlfalle am Ende der Kapillarkolonne mit flüssigem Stickstoff beschickt und am Reglerteil der Vorschub 1 und die Intervallzeit 40 eingestellt. Man läßt den Ofen nun 20 cm vorrücken und senkt dann den Wärmegradienten auf 130° C zu 80° C. Nach wei-

nach weiteren 40 cm wird auf 100°C zu 50° C gekühlt und die Destillation unter diesen Bedingungen zu Ende geführt.

6. G C - Analyse von Aromafraktionen
 auf gepackten Säulen

Vor der gaschromatographischen Analyse auf gepackten Säulen wird das Methanol durch Abblasen mit Stickstoff soweit entfernt, daß eine etwa 20 % ige Lösung vorliegt. Das verwendete Gaschromatographiegerät war ein "Carlo Erba Fractovap 2300."

- a) Stat. Phase: 2,5 % EGS auf Chromosorb G AW
DMCS 80 - 100 mesh
Säule: Glas, 3 m, innen ϕ 2 mm
Injektortemperatur: 220° C
Temperaturprogramm: 90° C - 180° C, 5° C/min
Trärgas: Stickstoff, 25 ml/min
- b) Stat. Phase: 5 % Carbowax 20 M auf Chromosorb G AW
80 - 100 mesh
Säule: Glas. 3 m, innen ϕ 2 mm
Injektortemperatur: 230° C
Temperaturprogramm: 70° C - 230° C, 5° C/min
Trärgas: Stickstoff, 25 ml/min
- c) Stat. Phase: 10 % FFAP auf Chromosorb G AW
80 - 100 mesh
Säule : Glas, 2 m, innen ϕ 2 mm
Injektortemperatur: 250° C
Temperaturprogramm: 70° C - 230° C, 5° C/min
Trärgas: Stickstoff, 30 ml/min

Die Versuche, einzelne Substanzen auf gaschromatographisch - präparativem Weg zu isolieren, wurden mit Hilfe der EGS - und der FFAP - Trennsäule vorgenommen. Dabei wurde in den vorhandenen Gaschromatographen vor dem Detektor ein Strömungsteilersystem eingebaut, das den aus der Säule kommenden Gasstrom im Verhältnis 1 : 20 auf - teilte. Der größere Anteil wurde - ohne den Detektor zu passieren - außerhalb des Gaschromatographen durch stickstoffgekühlte Glaskapillaren geleitet, und so die einzelnen Fraktionen auskondensiert.

7. Massenspektrometrische Untersuchungen

Gerät: Varian Aerograph Serie 2700 in Kombination mit Varian Mat CH 7.

GC - Bedingungen: den oben beschriebenen entsprechend.

MS - Parameter: Elektronenenergie: 70 e V,
Temperatur der Ionenquelle 220 ° C.

8. Methodik der Probenaufgabe auf Kapillarsäulen

8.1. Direkteinspritzung

Vor der Eingabe der Probe muß der Ofen des Gaschromatographen soweit abgekühlt sein, daß im Ofenraum eine Temperatur unter 40° C herrscht. Sodann erfolgt die Einspritzung von 1_μ l Probelösung bei geschlossenem Strö -

mungsteilerventil. Nach genau 30 sec wird der Strömungsteiler soweit geöffnet, daß ein Strömungsverhältnis 1 : 30 herrscht, und die Ofentemperatur auf 70° C eingeregelt. Bei Erscheinen des Lösungsmittelpeaks wird das Temperaturprogramm gestartet.

8.2. Eingabe mittels Feststoffprobengeber

Das gem. Seite 36 mit Aromasubstanz beladene Glaskapillärstück wird unter Stickstoff in die Eingabetrommel des Feststoffprobengebers überführt und das System mit Trägergas etwa 5 min begast, um restlichen Luftsauerstoff zu entfernen. Danach wird der Feststoffprobengeber gasdicht verschlossen und das Kapillärstück in den Verdampfer des Gaschromatographen eingeworfen. Nach einer Verdampfungszeit von 2 min wird der bis dahin kalte Ofen des Gaschromatographen auf 70° C aufgeheizt und das Temperaturprogramm eingeschaltet.

9. GC - Analyse von aus Vorstufen gewonnenen Aromafractionen auf Kapillarsäulen

- a) Säule: 20 m / 0,8 mm, FFAP
Injektortemperatur: 225° C
Temperaturprogramm: 70° C - 200° C, 1° C/min
Trägergas: Wasserstoff 2,5 ml/min
- b) Säule: 50 m / 0,8 mm, FFAP
Injektortemperatur: 225° C
Temperaturprogramm: 70° C - 200° C, 2° C/min
Trägergas: Wasserstoff 4,0 ml/min

- c) Säule: 20 m / 0,8 mm Ucon HB 5100
Injektortemperatur: 225° C
Temperaturprogramm: 70° C - 180° C, 5° C/min
Trägergas: Wasserstoff 2,5 ml/min
- d) Säule 20 m / 0,8 mm WG 11 (Polyäthylenglykol, Terephthalsäure)
Injektortemperatur: 225° C
Trägergas: Wasserstoff 3 ml/min
Temperaturprogramm:
1- schwerflüchtige Fraktion: 70° C - 220° C
3° C/min
2- mittelflüchtige Fraktion: 70° C - 220° C
2° C/min
3- Fraktion A: 70° C - 220° C
2° C/min

10. Gaschromatographische Bestimmung
der stickstoffhaltigen Substanzen

Hierzu fand der NPSD - Detektor der Firma Carlo Erba Verwendung. Vor der Analyse muß der Detektor auf höchste Stickstoffempfindlichkeit justiert werden. Für dessen Selektivität und seine Empfindlichkeit sind als Hauptparameter die Durchflußraten der Gase und die Positionen des Salzkristalls und der Polarisationselektrode über der Flamme maßgebend.

Zuerst werden folgende Gasdurchflußraten eingestellt:

Helium	(Trägergas)	2 ml/min
Stickstoff	(Nachbeschleuniger)	40 ml/min
Wasserstoff	(Brenngas)	30 ml/min
Luft	(Brenngas)	250 ml/min

Vor der Justierung, die mit Hilfe der am Detektor befindlichen Einstellschrauben (E) und (S) erfolgt, wird bei einer Abschwächung von 1 x 64 der Schreiber genau auf die Nulllinie gebracht. Die Stellung des Salzkristalls wird mit Hilfe der Schraube (S) so fixiert, daß der Ausschlag am Schreiber ein Maximum zeigt. Mit Schraube (E) läßt sich sodann die Polarisationselektrode in eine, für die Stickstoffempfindlichkeit optimale Stellung über die Flamme bringen. Das Optimum ist erreicht, wenn der Schreiber bei etwa 50 % Vollausschlag eine gerade Nulllinie aufweist.

Zur Überprüfung der Einstellung wird ein Testgemisch aus Valerolacton und Pyridin in methanolischer Lösung eingespritzt, um etwaige Abweichungen in der Konstanz der Meßbedingungen erkennen zu können.

Die GC - Bedingungen bei der Analyse des Aromastoffgemisches sind folgende:

Säule:	20 m / 0,8 mm	WG 11
Injektortemperatur:	225° C	
Temperaturprogramm:	70° C - 220° C,	3°/min
Trägergas:	siehe oben!	
Abschwächung:	1 x 32	

Bei Austausch des stickstoffselektiven Detektors gegen einen normalen FID wird lediglich der Stickstoffstrom abgeschaltet. Die übrigen Parameter bleiben bei der Messung des Vergleichschromatogrammes erhalten.

11. Kapillargaschromatographisch - massen -
spektrometrische Untersuchungen

Geräte: Finnigan Series 4000, GC - MS - Data System
LKP 2091

Ionisierungsenergie: 70 e V

Temperatur der Ionenquelle: 220° C

Die identifizierten Verbindungen sind im allgemeinen Teil in Tabelle 1, 2 und 3 zu finden.

12. Synthese von 3,3 - Dimethyl - 2 -
hydroxybutyrolacton

Die Ausgangssubstanz Dimethylhydroxybutyraldehyd wurde nach der im Organikum (49) beschriebenen allgemeinen Arbeitsvorschrift für Aldol - Reaktionen mit Formaldehyd dargestellt.

Ausbeute: 50 % Schmelzpunkt: 86° C

Die Synthese von 3,3 - Dimethyl - 2 - hydroxy - butyrolacton erfolgte nach der Methode von E. Carter und F. Ney.

Ausbeute: 30 % Schmelzpunkt: 75° C

MS: $\frac{m}{e}$ 73(5) 72(11) 71(100) 68(8) 58(5)
55(12) 53(9) 43(44) 41(30)

13. Isolierung und GC - Analyse von
 Aromafraktionen aus unconchierten
 und conchierten Schokoladenmassen

Proben 1: Schokoladenmasse vorverflüssigt, unconchiert, ohne Zusatz von Vanillin

2: Schokoladenmasse fertig conchiert, ohne Zusatz von Vanillin

Isolierung: Die Entfettung von 250 g Schokoladenmasse erfolgt durch 3 malige Rührextraktion mit je 250 ccm Petroläther (40° C - 60° C). Der Rückstand wird mit 3 x je 200 ml Äthanol p. a. extrahiert. Nach dem Abnutschen zieht man das Lösungsmittel der vereinigten Filtrate am Rotationsverdampfer so ab, daß der Rückstand in dünner Schicht auf der Oberfläche eines 25 ml Schliffkölbchens verbleibt. Die anschließende Hochvakuumdestillation wird in der in Nr. 3.2. beschriebenen Form durchgeführt. Die Ausbeute an schwerflüchtigem Aromaöl beträgt etwa 10 ppm (bezogen auf Schokoladenmasse.)

GC - Analyse:

Gerät:	Carlo Erba Fractovap 2300
Säule:	25 m/0,8 mm WG 11
Injektortemperatur:	225° C
Temperaturprogramm:	70° C - 220° C, 3° C/min

14. Quantitative Bestimmung von
3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro -
6 - methyl - 4 H - pyran - 4 - on

100 g des entfetteten Rückstandes werden 3 mal mit je 200 ml Methylenchlorid extrahiert und der Extrakt im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird anschließend bei 80° C und 0.1 Torr destilliert, wobei ein farbloses, teils öliges, teils kristallinisches Produkt übergeht. Das Destillat wird in 10 ml einer wasserfreien methanolischen 0.5 n HCL - Lösung aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dabei setzt sich das 3,5 - Dihydroxy - 2,3 - dihydro - 6 - methyl - pyran - 4 - on in Isomaltol - methyläther um. Danach dampft man im Vakuum ab und destilliert den Rückstand bei 80° C und 0.1 Torr, wobei farblose Kristalle entstehen, die in Methylenchlorid aufgenommen werden. Zur anschließenden quantitativen gaschromatographischen Bestimmung wird Maltolmethyläther als innerer Standard der Lösung zugesetzt.

GC - Bedingungen:

Gerät:	Varian Series 2700
Säule:	Stahlsäule, 2m, 1/8", 2,5 % SP 1000 auf Chromosorb G AW DMCS 80 - 100 mesh
Säulentemperatur:	200° C
Injektortemperatur:	250° C

Lebenslauf

=====

Ernst Brunner

geboren am 21.6.1949 in München
als Sohn des Volksschulrektors
Ernst Brunner und seiner Ehefrau
Maria, geb. Seitz.

Verheiratet am 25.7.1975 mit
Angelika Brunner, geb. Haller.

Schulen

1955 - 1959 Volksschule an der
Grandlstraße in München,
1959 - 1960 Volksschule an der
Eversbuschstraße in München,
1960 - 1969 Max - Planck - Gym-
nasium in München - Pasing.

Reifeprüfung

28. 6. 1969.

Berufsausbildung

WS 1969 - WS 1973 Studium der
Lebensmittelchemie an der Uni-
versität München.

Vorprüfung

April 1972.

Hauptprüfung Teil A

12. Dezember 1973.

Juli 1977 - Dezember 1977 Prak-
tikum für die Hauptprüfung Teil B
am Landesuntersuchungsamt für das
Gesundheitswesen Südbayern,
Abteilung Chemie.

Hauptprüfung Teil B

Dezember 1977.

Seit März 1974 arbeite ich unter Anleitung von Herrn
Professor Dr. Th. Severin und unter der Betreuung von
Herrn Dr. W. Mohr am Institut für Lebensmitteltechnologie
und Verpackung e. V. an der vorliegenden Dissertation.

